



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação de Peptídeos Recombinantes e Sintéticos na Proteção da
Cisticercose em Modelo Experimental Murino**

Marianna Nascimento Manhani

Uberlândia - MG

Agosto - 2013



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação de Peptídeos Recombinantes e Sintéticos na Proteção
da Cisticercose em Modelo Experimental Murino**

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

Marianna Nascimento Manhani
(Doutoranda)

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

Prof.^a. Dr^a. Cristiane Queixa Tilelli
(Co-orientadora)

Uberlândia – MG
Agosto – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M277a Manhani, Marianna Nascimento, 1984-
2013 Avaliação de peptídeos recombinantes e sintéticos na proteção da
 cisticercose em modelo experimental Murino / Marianna Nascimento
 Manhani. – 2013.
 107 p. : il.

Orientador: Julia Maria Costa Cruz.

Coorientador: Cristiane Queixa Tilelli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Cisticercose - Teses. 3. Peptídeo - Teses.
I. Julia Maria Costa Cruz. II. Tilelli, Cristiane Queixa. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

*Ao meu pai, Paulo Roberto, em memória de
minha mãe, Aparecida, aos meus irmãos, Mellina
e Ivan, ao meu marido, Renato e aos amigos que
me acompanharam nessa etapa tão importante da
minha caminhada.*

Agradecimentos

À **Deus** por me amparar em cada dificuldade encontrada e me dar forças para enfrentar todos os desafios e aprender uma nova lição de vida a cada vitória.

À minha orientadora **Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz** pela compreensão, pelos conselhos e orientações durante todo o estudo.

À professora **Dra. Cristiane Queixa Tilelli** pela co-orientação, apoio e auxílio na realização deste estudo.

Ao professor **Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho** pela parceria na execução deste estudo.

A todos os amigos do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses, em especial **Vanessa da Silva Ribeiro, Daniela da Silva Nunes, Henrique Tomaz Gonzaga, Nágilla Daliane Feliciano**, pelo auxílio técnico e metodológico durante o estudo, pelos momentos de descontração e por tantas vezes me tranquilizarem quando as coisas saiam errado. À técnica **Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires**, que me auxiliou na obtenção de parte do material e esclarecendo dúvidas na metodologia dos testes imunológicos.

Aos meus amigos da Universidade Federal de São João Del Rei, pelo apoio e palavras de conforto nos momentos de dificuldade. Em especial à **Mariana Amorim de Oliveira**, que me auxiliou em alguns experimentos e me acompanhou de perto nessa jornada.

Aos meus pais **Paulo Roberto Manhani e Aparecida Nascimento Manhani (in memorian)**, aos meus irmãos **Mellina Nascimento Manhani e Ivan Nascimento Manhani**, e ao meu marido **Renato Penha Machado**, pelo incentivo na busca pelo conhecimento, pelo apoio nos momentos de angústia e por vivenciarem comigo todos os desafios dessa etapa vencida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mCc48	peptídeo Cc48 expresso em bacteriófago M13
sCc48	peptídeo Cc48 sintético
SNC	sistema nervoso central
NC	neurocisticercose
LCR	líquido cefalorraquidiano
NI	neuroimagem
TC	tomografia computadorizada
RM	ressonância magnética
ELISA	ensaio imunoenzimático adsorvente
WB	western blot
EITB	eletroimunotransferência blot
OPAS	organização pan-americana de saúde
PCR	reação em cadeia da polimerase
FTIED	força tarefa internacional para erradicação de doenças
AMS	assembleia mundial de saúde
CEPEA	comissão de ética em pesquisas envolvendo animais
PEG/NaCl	polietileno glicol/Cloreto de sódio
TBS	solução tamponada de tris
PBS	solução de tampão fosfato
dpi	dias após infecção
PBS-T	solução de tampão fosfato adicionado tween 20
PBS-TM	solução de tampão fosfato adicionado tween 20 e leite em pó desnatado
OPD	ortofenilenodiamina
TMB	tetrametilbenzidina
DO	densidade ótica
IA	índice de avidez
BLAST	basic local alignment search tool
N.C.	não consta
C.A.	circunferência abdominal
T.C.S.C.	tamanho corporal sem cauda
T.C.T.	tamanho corporal total

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. CISTICERCOSE.....	10
1.1.1. PARASITO	10
1.1.2. SINTOMATOLOGIA	11
1.1.3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	14
1.1.4. DIAGNÓSTICO	15
1.1.5. TRATAMENTO.....	18
1.1.6. EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.1.7. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO	22
1.2. MODELO EXPERIMENTAL DE CISTICERCOSE MURINA.....	23
1.3. EXPOSIÇÃO DE PEPTÍDEOS EM BACTERIÓFAGOS	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO	30
3.2. ASPECTOS ÉTICOS	30
3.3. PEPTÍDEO EXPRESSO EM FAGO SELECIONADO POR <i>PHAGE DISPLAY</i>	30
3.4. PEPTÍDEO SINTÉTICO	31
3.5. ANIMAIS	31
3.6. IMUNIZAÇÃO.....	32
3.7. DADOS PARASITOLÓGICOS.....	33
3.8. DOSAGEM DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS.....	33
3.9. ELISA AVIDEZ	35
3.10. DOSAGEM DE CITOCINAS.....	35
3.11. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	36
3.12. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
3.13. ANÁLISE PELO BLAST	36
3.14. NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	37

3.15. ANÁLISE DOS DADOS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. DADOS MORFOMÉTRICOS	38
4.2. IMUNIZAÇÃO.....	40
4.3. DOSAGEM DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS.....	42
4.4. ELISA AVIDEZ.....	46
4.5. DOSAGEM DE CITOCINAS	47
4.6. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	49
4.7. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	63
4.8. ANÁLISE PELO BLAST.....	65
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS	94
APÊNDICES	97

RESUMO

A cisticercose humana é uma parasitose causada pela infecção por metacestódeos de *Taenia solium*. O quadro mais grave é o acometimento do sistema nervoso central, causando neurocisticercose. Apesar das tentativas de erradicação da doença, a cisticercose continua sendo um grave problema de saúde pública, e o desenvolvimento de uma vacina pode ser uma alternativa para o seu controle. O objetivo desse estudo foi testar o mimotopo Cc48 de *T. solium* no controle da cisticercose murina experimental. O peptídeo Cc48 foi testado expresso em bacteriófagos M13 (mCc48) e como peptídeo sintético (sCc48). Foram utilizados 160 camundongos BALB/c divididos em quatro grupos: G1 (n = 40), camundongos imunizados com mCc48; G2 (n = 40), imunizados com peptídeo sCc48; G3 (n = 40) inoculados com salina e G4 (n = 40) inoculados com salina. Após a imunização, os camundongos dos grupos G1, G2 e G3 foram desafiados com metacestódeos de *Taenia crassiceps*, e G4 não recebeu metacestódeos por ser o controle negativo do experimento. Os animais foram sacrificados em quatro pontos: 15, 30, 45 e 60 dias após infecção (dpi), para recolher amostras de sangue e realizar a contagem de metacestódeos. A contagem de metacestódeos foi usada para determinar a proteção conseguida pela imunização. Amostras de soro obtidas a partir do sangue coletado foram testadas por ELISA para verificar a produção de anticorpos (IgM, IgG, IgA e IgE), testar a avidéz de IgG e quantificar citocinas (IL-4, INF-gama). Contagens totais e diferenciais de leucócitos foram realizadas com amostras de sangue. Foi realizado o teste de imunofluorescência indireta com os soros dos camundongos, contra metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium*. Em relação à contagem de metacestódeos, apenas a imunização com sCc48 diminuiu o número de metacestódeos e de animais infectados, induzindo 90% de proteção e eficácia de 98% no ponto 60 dpi. O G1 apresentou uma alta produção de IgM e IgG, e teve detecção de IgE, enquanto no G2 o principal anticorpo detectado foi IgG. IgG dos animais do G2 apresentou alta avidéz. Houve um aumento significativo na contagem de leucócitos no G1. Detectou-se IL-4 em todos os grupos, e alguns animais dos grupos G1, G2 e G3 apresentaram IFN-gama. Pela imunofluorescência verificou-se a reatividade cruzada dos anticorpos produzidos com as espécies testadas. A capacidade do peptídeo sintético sCc48 para induzir proteção o torna um potencial composto contra cisticercose.

Palavras-chave: cisticercose experimental, peptídeo Cc48, imunização, proteção.

EVALUATION OF PEPTIDES IN THE CONTROL OF EXPERIMENTAL CYSTICERCOSIS.

ABSTRACT

Human cysticercosis is caused by installation of metacestodes of *Taenia solium*. The most serious condition is the infection of the central nervous system, which leads to neurocysticercosis. Despite attempts to eradicate the disease, cysticercosis remains a serious public health issue, and the development of a vaccine may be an alternative to control the disease. The aim of this study was to test the feasibility of mimotope Cc48 from *T. solium* to control of experimental murine cysticercosis. Peptide Cc48 was tested as expressed in bacteriophage M13 (mCc48) and as a synthetic peptide (sCc48). A total of 160 BALB/c mice were used, being divided into four groups: G1 (n = 40): mice immunized with mCc48, G2 (n = 40): immunized with peptide Cc48, G3 (n = 40) and G4 (n = 40): inoculated with saline. After immunization, mice from groups G1, G2 and G3 were challenged with *Taenia crassiceps* metacestodes, while those in group G4 did not received cysticercus for being the negative control of the experiment. The animals were sacrificed at four points: 15, 30, 45 and 60 days after infection (dai), to collect blood samples and perform cysticerci count. The count of cysticerci was used to analyze the protection achieved by immunization. Serum samples were obtained from collected blood and were tested by ELISA to verify the production of antibodies (IgM, IgG, IgA, and IgE), test IgG avidity and quantify cytokines (IL-4, INF-gamma). Total and differential leukocyte counts were performed in blood samples. Indirect immunofluorescence tests were done with sera from mice against cysticerci of *T. crassiceps* and *T. solium*. Immunization with sCc48 decreased the number of cysticerci and infected animals, inducing 90% of protection and efficacy of 98% in point 60 dai. G1 had higher IgM and IgG production and presence of IgE, while in G2 IgG was the main antibody detected. G1 presented significant increase in leukocytes production. IL-4 production was detected in all groups, and some animals in groups G1, G2 and G3 presented IFN-gamma. Cross-reactivity of antibodies produced with both tested species was observed through immunofluorescence. The ability of synthetic peptide sCc48 to induce protection makes it a potential compound against cysticercosis.

Key words: experimental cysticercosis, peptide Cc48, immunization, protection.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cisticercose

1.1.1. Parasito

Devido suas características, a espécie *Taenia solium*, pertence à família Taeniidae; ordem Cyclophyllidea, caracterizada por parasitos encontrados no intestino delgado, com escólex possuindo quatro ventosas com ou sem rostro; classe Cestodea ou Cestoda, devido à presença de órgão de fixação na porção anterior, o escólex, também por apresentar o corpo segmentado em proglótes e oncosfera ou embrião hexacanto; e filo Platyhelminthes, por ter simetria bilateral, corpo achatado dorso-ventralmente e ser hermafrodita. *T. solium* apresenta três estágios no seu desenvolvimento: adulto, ovo e metacestódeo (REY, 2001). O parasito adulto habita exclusivamente o intestino delgado humano. Esta forma evolutiva é um verme comprido e achatado que mede aproximadamente dois a quatro metros (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005) e é constituído de um grande número de proglótes e este número varia de 800 a 900 por parasito, que juntas constituem o estróbilo. As proglótes apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas (REY, 2001; GARCIA et al., 2002). As últimas proglótes são liberadas juntamente com as fezes, sendo que cada uma destas proglótes contêm aproximadamente 50.000 ovos (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006). Os ovos são bastante resistentes, podendo permanecer viáveis por mais de oito meses sob condições ambientais adequadas (locais quentes e úmidos), aumentando assim a possibilidade de transmissão (PÊSSOA; MARTINS, 1982), e no estômago ou intestino delgado do animal, eles se rompem, liberando o embrião hexacanto, também conhecido como oncosfera. O embrião hexacanto desenvolvendo-se na forma metacestódea (HAWK et al., 2005; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006), que consiste de uma vesícula translúcida, medindo aproximadamente 1 a 3 cm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, repleta de fluido ou líquido vesicular esbranquiçado e com um escólex invaginado (ALARCÓN, 2006; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

T. solium é um parasito zoonótico, tendo o suíno como hospedeiro intermediário (HI) primário, que ao ingerir ovos ou proglótes grávidas liberadas junto com as fezes

humanas desenvolvem a forma metacestódea. Os ovos se rompem no estômago ou intestino delgado liberando o embrião hexacanto ou oncosfera, este penetra a parede do intestino delgado e através dos vasos sanguíneos alcança os músculos somáticos, olhos e sistema nervoso central (SNC) do suíno causando cisticercose (HAWK et al., 2005; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL). O ser humano é o único hospedeiro definitivo (HD) natural albergando o parasito adulto, ao ingerir metacestódeos viáveis presentes na carne suína, este alcança o intestino delgado, onde ocorre a evaginação do escólex e sua adesão à mucosa intestinal e o desenvolvimento do estróbilo a partir da região do pescoço ou colo, configurando a instalação da forma adulta no intestino delgado, e em três a quatro meses, o parasito alcança maturidade, resultando na teníase, com liberação de ovos e proglótes junto com as fezes. O ser humano pode se converter em HI acidental desenvolvendo a forma metacestódea, causando a cisticercose humana, através da ingestão de ovos do parasito (PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005; YAQOOB et al., 2009; BRUNETTI; WHITE JR, 2012).

Apesar de a contaminação da cisticercose ter sido atribuído principalmente à heteroinfecção através da ingestão de água e alimentos contaminados com ovos, estudos epidemiológicos sugerem que a via mais comum é através da via fecal-oral devido à presença de um portador assintomático de teníase (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006). Alternativamente, aqueles indivíduos com a forma adulta do parasito podem se autoinfectar devido uma reversão no peristaltismo, assim os ovos ou proglótes regurgitados no estômago são estimulados a liberar o embrião hexacanto e inicia-se o ciclo semelhante ao que ocorre no suíno (HAWK et al., 2005).

A localização dos metacestódeos no ser humano compromete principalmente tecido subcutâneo, músculo esquelético, coração, pulmão, osso, cordão espinhal, a cavidade oral e SNC (SOBNACH et al., 2009). A infecção do SNC com formas metacestódeas de *T. solium* é denominada neurocisticercose (NC) e revela-se como a localização mais importante por sua frequência e gravidade (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; ALARCÓN, 2006; DUA; ANEJA, 2006).

1.1.2. Sintomatologia

A NC é a parasitose mais frequente do SNC (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006; ABRAHAM et al., 2010), e apresenta diversos processos patológicos

que diferem devido à localização e viabilidade do cisticerco, e mecanismos de agressão e resposta imunológica do hospedeiro, como síndromes neurológicas que variam desde a infecção assintomática até a morte repentina (LINO-JUNIOR et al., 2007; SINHA; SHARMA, 2009; SINGHI, 2011). Não há manifestações patognomônicas ou típicas da síndrome de NC (ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; MOSKOWITZ; MENDELSON, 2010).

No cérebro, os metacestódeos localizam-se mais frequentemente nos hemisférios ou parênquima cerebral e com menos frequência nos gânglios basais, cerebelo, tronco cerebral, ventrículos (preferencialmente no IV ventrículo), espaço subaracnóideo e cordão medular, estes podem também localizar-se no espaço subdural, região selar, e espaço subaracnóideo extramedular. Os metacestódeos podem ser únicos ou múltiplos, chegando à centenas (DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

Existem quatro estágios de desenvolvimento dos metacestódeos parenquimatosos: vesicular, coloidal, granular ou nodular e calcificado. No estágio vesicular, os metacestódeos são considerados viáveis e compreendem-se de vesículas preenchidas de líquido vesicular, com escólex invaginado, e uma vez estabelecido no espaço intraparenquimatoso, evadem do sistema imunológico utilizando vários mecanismos, incluindo inibição do complemento, liberação de citocinas, e mimetismo através de imunoglobulinas do hospedeiro, causando mínimas alterações inflamatórias no tecido circundante. O processo degenerativo do cisticerco inicia quando o sistema imune do hospedeiro e a resposta inflamatória ultrapassam os mecanismos de evasão, resultando na morte do parasito. No primeiro estágio de degeneração, ou coloidal, o líquido vesicular se torna opaco e denso e o escólex mostra sinais de degeneração, rodeado de uma cápsula de colágeno grossa e irregular, e o tecido em volta apresenta gliose astrocítica e edema difuso. Posteriormente, a parede engrossa e o escólex se transforma em grânulos mineralizados, constituindo o estágio granular. No estágio final, ou calcificado, o parasito aparece como um nódulo mineralizado (SOTELO; GUERRERO; RUBIO, 1985; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006).

A forma metacestódea pode persistir no hospedeiro humano por longos períodos sem licitar uma reação inflamatória, permanecendo assintomático. Em contraste a resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar a doença sintomática (CARPIO, 2002; ALARCÓN, 2006). Entre os sintomas de pacientes com NC

os principais são: epilepsia/convulsões, dores de cabeça, déficit focal e sinais de aumento da pressão intracraniana (CARABIN et al., 2011).

O metacestódeo localizado no parênquima geralmente está associado com um bom prognóstico. Frequentemente, pacientes com poucos metacestódeos intraparenquimais permanecem assintomáticos, apesar de alguns pacientes desenvolverem ataques epiléticos. Por outro lado, pacientes com intensa infecção cerebral podem desenvolver ataques epiléticos incontroláveis e deficiência cognitiva, estes ataques são mundialmente relatados como o sintoma mais comum, ocorrendo em 70 – 90% dos pacientes, sendo a NC considerada a principal causa de epilepsia tardia em áreas endêmicas (DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; PRASAD et al., 2009).

Quando os metacestódeos são extraparenquimais, há uma tendência ao crescimento irregular e desenvolvimento da resposta inflamatória mais grave. A localização do metacestódeo no sistema ventricular pode causar, em 10 – 20% dos casos, hipertensão intracranial aguda secundária à hidrocefalia. Pode ocorrer ainda, manifestação de hidrocefalia aguda intermitente com dor de cabeça, ataques de vertigem posicional, ou perda da consciência induzidas por movimentos abruptos da cabeça (síndrome de Brun), ou mesmo morte, devido a presença de metacestódeo ventricular móvel. Metacestódeos no espaço subaracnóideo podem alcançar vários centímetros de diâmetro (metacestódeos gigantes) causando hipertensão intracranial com hemiparesia, ataques parciais ou outros sinais neurológicos focais. Estes parasitos podem ainda invadir as cisternas da base, levando ao desenvolvimento da forma racemosa, causando hipertensão intracranial, meningite crônica, hidrocefalia, aracnoidite e vasculite (MACHADO, 2010). O pior prognóstico da NC está associado com o acometimento subaracnóideo da base, no qual vesículas nas cisternas crescem de maneira desorganizada, infiltram estruturas vizinhas, e estão associadas com grave resposta inflamatória local, com alta concentração de proteína e células no líquido cefalorraquidiano (LCR), causando meningite subaguda, devido à intensa reação inflamatória gerando o espessamento das leptomeninges da base do cérebro. O espessamento leptomeníngeo pode obstruir a circulação do LCR em aproximadamente 50 – 60% dos casos, resultando em hidrocefalia e hipertensão intracranial progressiva, e mortalidade em mais de 20% dos pacientes (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; SINHA; SHARMA, 2009). A encefalite secundária à NC é mais frequente em crianças e mulheres jovens, e se caracteriza por perda da consciência, crises convulsivas, diminuição da visão, cefaleia, vômito e papiledema

(DEL BRUTTO, 2005). O envolvimento do cordão espinhal é raro, sendo responsável por 1 – 5% dos casos de NC. Os sinais clínicos podem ser causados diretamente pela compressão do cordão espinhal e/ou movimentos do metacestódeo ou, indiretamente, devido à reação inflamatória, induzindo paralisia progressiva (HAWK et al., 2005; TAKAYANAGUI, ODASHIMA, 2006).

Aproximadamente 50% dos casos de NC são assintomáticos ou clinicamente silenciosos, e o curso da doença sintomática e a resposta inflamatória do hospedeiro são altamente variáveis (BUENO, 2012).

1.1.3. Resposta imunológica

Existem poucos estudos que discutem a resposta imune celular na NC, e a maioria deles apresentam uma imunossupressão em vários hospedeiros como nos humanos, suínos e em camundongos experimentalmente infectados, sendo que nos pacientes com NC a imunossupressão é antígeno específica (BUENO, 2012; SILVA, TAKAYANAGUI, 2011).

Em pacientes com NC verificou-se aumento de linfócitos T (LT) e B (LB), e de eosinófilos tanto no sangue quanto no LCR. Estudos mais específicos, revelaram aumento de LB, diminuição de LT CD8+, porém sem variações nas populações de LT CD4+ (SILVA, TAKAYANAGUI, 2011)

Acredita-se que o perfil imunoinflamatório da NC com manifestações clínicas está relacionado com linfócitos T *helper* (Th) 1, enquanto que o curso silencioso da doença relaciona-se com o perfil Th2 (CHAVARRÍA et al., 2003). Visto que o perfil de citocinas apresenta um aumento nos níveis de IFN-gama, IL-2 e TNF-beta (SILVA, TAKAYANAGUI, 2011).

Bueno et al. (2004) apresentaram uma predominância de resposta Th1 na inflamação em pacientes com NC e um misto de Th1/Th2 no perfil não inflamatório. Chavarría et al. (2006) descreveram a resposta imune periférica específica relacionada com as diferentes formas da NC, e nos casos assintomáticos houve uma predominância do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) com baixos níveis plasmáticos de todas as subclasses de IgG, e nos pacientes sintomáticos houve uma depressão na resposta imune celular com aumento de todas as subclasses de IgG, além disso, os autores correlacionaram a gravidade da NC com o aumento da celularidade no LCR, caracterizado por níveis aumentados de subclasses de IgG, IL6/IL5/IL10, proteínas e eosinófilos.

Na resposta humoral, há predominância de imunoglobulinas G (IgG), aumento menos acentuado de IgE e IgM (REY, 2001) e de IgA (SILVA, TAKAYANAGUI, 2011) no soro de pacientes. Em estudo desenvolvido por Odashima; Takayanagui; Figueiredo (2002), observou-se que há elevação de anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgE e IgA no LCR, com predomínio de IgM no LCR (SILVA, TAKAYANAGUI, 2011).

1.1.4. Diagnóstico

Para estabelecer o diagnóstico de NC é necessária uma interpretação correta dos sinais e sintomas clínicos, exames de neuroimagem (NI) e testes imunológicos, sempre considerando a epidemiologia relacionada ao paciente (ALARCÓN, 2006). Um conjunto de critérios é utilizado para avaliar objetivamente todos esses dados estabelecendo assim o grau de certeza do diagnóstico da NC em definitiva ou provável. O diagnóstico definitivo refere-se à demonstração do escólex do cisticerco em técnicas de NI, ou quando há lesões sugestivas e teste imunológico positivos, ou ainda a somatória desses às manifestações clínicas sugestivas e dados epidemiológicos. O diagnóstico provável é estabelecido quando não é possível a realização de NI, ou ainda a união dos exames de imagem aos imunológicos e dados epidemiológicos (DEL BRUTTO et al., 1996). Uma classificação mais recente proposta por Del Brutto (2012), inclui quatro categorias de critérios, da seguinte forma: 1) critérios absolutos: demonstração histológica do parasito, lesões císticas com escólex nos testes de imagem, e visualização direta do parasito por exame de fundo ocular; 2) critérios principais: lesões altamente sugestivas de NC em estudos de NI, soro positivo no teste de EITB (*enzyme-linked immunoelectrotransfer blot*), desaparecimento de lesões císticas intracranial após a terapia, e resolução espontânea de lesões únicas; 3) critérios menores: lesões compatíveis com as de NC em estudos de NI, manifestações clínicas sugestivas de NC, LCR positivo no teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), e cisticercose fora do SNC; e 4) critérios epidemiológicos: evidência de contato com familiar portadores de teníase, indivíduos que proveniente ou vivem em área endêmica de cisticercose, histórico de viagem frequente às áreas endêmicas. A interpretação destes critérios permite dois graus de certeza diagnóstica: 1) diagnóstico definitivo, nos pacientes que têm um critério absoluto ou naqueles que têm dois critérios principais mais um critério menor e um epidemiológico; e 2) diagnóstico provável, nos pacientes que têm um critério principal mais dois critérios menores, ou um critério

principal mais um critério menor e um epidemiológico, ou com três critérios menores mais um critério epidemiológico. Devido à maior complexidade da última classificação, muitos pesquisadores continuam adotando a classificação de Del Brutto et al. de 1996 para definir o diagnóstico da NC.

A confirmação patológica por biópsia ou autópsia é o único padrão ouro no diagnóstico da NC, porém apresenta limitações. O diagnóstico definitivo pode ser estabelecido quando o escólex é visualizado nos métodos diagnóstico de NI: tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (ALARCÓN, 2006; HUSAIN et al., 2007). Com exceção das lesões nas quais é possível identificar o escólex, a maioria dos outros achados não é específica e podem ser encontradas em outros tipos de infecção do SNC. Quando não se observa o escólex nos estudos de imagem, devem-se considerar várias condições de diagnóstico diferencial, como tuberculomas, toxoplasmose, histoplasmose, sarcoidose e neoplasias intracraniais (PRETELL et al., 2005; ALARCÓN, 2006).

Os métodos de imunodiagnóstico mais utilizados na NC são ELISA e *Western Blotting* (WB), que podem ser realizados utilizando amostras de soro ou LCR (COSTA et al., 1982; COSTA, 1986; TSANG; BRAND; BOYER, 1989; DORNY et al., 2003; PARIJA et al., 2004; ALARCÓN, 2006; DECKERS; DORNY, 2010).

A maioria dos laboratórios de diagnóstico de NC utiliza EITB com antígenos glicoproteicos (GPs) purificados para detecção de anticorpos, demonstrando 98% de sensibilidade e 100% de especificidade (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; PARIJA et al., 2004; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006) e este método é aceito pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) como o método imunológico de escolha (FERRER et al., 2007). Porém, em pacientes com um único metacestódeo cerebral a sensibilidade é de 25% – 30%, e o resultado pode ser negativo na NC calcificada, além de ter reação cruzada em pacientes com teníase ou cisticercose extracerebral (DEL BRUTTO, 2005; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006). O uso de GPs purificadas é limitado devido à tecnologia necessária para o ensaio, alto custo e complexidade do processo de purificação (SILVA et al., 2006). Em países em desenvolvimento o teste ELISA é preferido, devido maior viabilidade, simplicidade de execução e baixo custo, comparado ao WB (DORNY et al., 2003), porém pode apresentar resultados falso positivos e falso negativos (ALARCÓN, 2006).

A baixa reprodutibilidade combinada com a frequente indisponibilidade de material do parasito tem estimulado o desenvolvimento e uso de antígenos recombinantes como a proteína de 14 kDa (TS14), as moléculas recombinantes Ts8B1, Ts8B2 e Ts8B3, o antígeno recombinante de *T. solium* de 10 kDa e as proteínas TSOL18 e TSOL45 (SILVA et al., 2006; FLISSER et al., 2004; FERRER et al., 2007; LIGHTOWLERS, 2006; MANDAL et al., 2008). Os principais polipeptídeos recombinantes estudados para utilização pelo WB e ELISA são os de 10, 7 – 10 e 14kDa (DORNY et al., 2003).

Como a detecção de anticorpos pode indicar exposições e não necessariamente a infecção, pois os anticorpos podem persistir por longos anos depois de eliminação do parasito, sua detecção pode resultar em falsa positividade e terapia desnecessária. Ensaio utilizando anticorpos monoclonais para detecção de antígenos têm sido desenvolvidos, sendo que a detecção de antígeno indica infecções recentes, e pode ser uma ferramenta sorológica no monitoramento da terapia (PARDINI et al., 2001; DORNY et al., 2003; PARIJA et al., 2004). Um exemplo disso é o HP10 Ag-ELISA, pois o antígeno HP10 secretado pelo metacestódeo é uma método altamente sensível para o diagnóstico de parasitos vesiculares localizados nos espaços ventriculares ou subaracnoide da base do cérebro, além disso é uma ferramenta útil no acompanhamento dos pacientes (FLEURY et al., 2013). O uso do Dot ELISA e ELISA padrão para detecção de antígeno no LCR demonstraram 59% e 77% de positividade, respectivamente. Outro método de ELISA baseado no anticorpo monoclonal desenhado para detectar a presença de antígenos excretórios/secretórios mostrou 86% de sensibilidade na detecção destes antígenos no LCR (PARIJA et al., 2004). Abraham et al. (2010) estudaram a detecção de antígenos de *Taenia* em LCR e apontam algumas contribuições desse tipo de estudo, como, o diagnóstico etiológico das fases transitórias da NC sem imagem característica. Além disso, o diagnóstico da forma racemosa pode alcançar alta sensibilidade e especificidade somente com a análise do LCR (MACHADO, 2010).

Em muitos países é difícil obter suínos infectados com *T. solium* para preparação de antígenos, assim muitas pesquisas buscam fontes alternativas de antígenos para o imunodiagnóstico da NC (ARRUDA et al., 2005) como o extrato antigênico de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (LARRALDE et al., 1989; BUENO et al., 2001; DORNY et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005; SUZUKI et al., 2007) e o antígeno obtido de metacestódeos de *T. saginata* (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; NUNES et al., 2013).

A utilização de métodos moleculares também é uma realidade. Almeida et al. (2006) descreveram uma reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) para o diagnóstico da NC, na qual foi obtida especificidade de 100% e sensibilidade de 96,7%.

1.1.5. Tratamento

A respeito do tratamento, apesar de nos últimos 25 anos ter sido atribuído a fármacos cisticidas, geralmente associados a corticoides, não existe conclusão definitiva da eficácia destes tratamentos. O tratamento disponível para NC pode ser resumido em: 1) prevenção e controle sanitário; 2) fármacos cisticidas ou anti-helmínticos; 3) corticoides e outros fármacos imunossupressores; 4) fármacos antiepilépticos; 5) diuréticos para manejar a hipertensão intracraniana; e 6) procedimentos cirúrgicos (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). Os fármacos antiparasitários utilizados no tratamento da NC são albendazol e praziquantel (GARCIA et al., 2002; ENSEÑAT et al., 2007). A decisão do tratamento deve levar em conta sintomas, localização, número, estágio e tamanho dos cistos (KRAFT, 2007). Porém, não há consenso universal ou guia para o manejo das diferentes formas da doença, mas existe uma concordância no uso de anti-helmínticos para cistos viáveis e de corticoides em pacientes com encefalite (RAMÍREZ-ZAMORA; ALARCÓN, 2010). O estudo de Abba; Ramaratnam; Ranganathan (2010) sugere que o tratamento de metacestódeos viáveis com albendazol pode reduzir o número de lesões, e diminuir crises convulsivas recorrentes em casos de metacestódeos não viáveis. No entanto, muito pacientes assintomáticos para NC podem apresentar sintomas após uso de anti-helmínticos para controle de parasitos intestinais (RAMOS-ZÚÑIGA et al., 2013). Segundo Garcia; Gonzalez; Gilman (2011), o tratamento deve ser individualizado, e as medidas iniciais devem ser focadas no manejo dos sintomas antes de considerar alguma terapia antiparasitária quando apropriadas, e além disso, a categorização do paciente, novos regimes de drogas anti-helmínticas e cirurgias com mínimo de invasão estão melhorando o prognóstico de pacientes com NC.

1.1.6. Epidemiologia

O complexo teníase/cisticercose destaca-se como um sério problema econômico e de saúde pública, particularmente na América do Sul e Central, Índia, África, leste da Ásia, leste Europeu, e outros países em desenvolvimento, e é estimado que 50 milhões de indivíduos estejam infectados e que 50.000 morram a cada ano. Acredita-se que cerca de 350.000 pessoas encontram-se infectadas na América Latina (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001), e, ainda, a NC vem emergindo como um sério problema de saúde pública em vários países, como nos Estados Unidos da América (CARPIO, 2002; WILLINGHAM; ENGELS, 2006).

A frequência da NC varia de 0,2% a 52% mundialmente, e sua associação com epilepsia varia de 0,11% a 1,32% (NDIMUBANZI et al., 2010). O principal fator de risco para aquisição da NC é a presença de portadores da forma adulta do parasito (FLISSER et al., 2003), associado com pouca higiene, precárias condições de vida, e acesso de suínos às fezes humanas (PAL; CARPIO; SANDER, 2000). No estudo de Lescano et al. (2009) confirmou-se este fato, pois foi observado soroprevalência significativa para cisticercose humana ao redor de portadores de teníase, com 21% de soropositividade quando o portador se encontrava a mais de 50 metros (m), 32% quando o paciente com teníase estava entre 1–50 m, e 64% quando o portador de teníase e o paciente com NC residiam na mesma casa.

A cisticercose é classificada como uma doença infecciosa emergente em alguns países desenvolvidos. Nos Estados Unidos da América (EUA) deve-se à imigração de populações originárias de áreas endêmicas, principalmente para o estado da Califórnia, indivíduos de origem hispânica para o estado do Kansas, e no Texas está presente em indivíduos nascidos no México e na América Central, mas também em pacientes americanos, e outro fator que está relacionado a esse aumento é a melhora nos exames de neuroimagem acionando em um melhor diagnóstico (DEGIORGIO et al., 2005; DEL LA GARZA et al., 2005; DANIELS; MOORE, 2006). Na Espanha, esta enfermidade voltou a surgir devido ao processo migratório de habitantes de áreas endêmicas, principalmente andinos (GIMÉNEZ-ROLDÁN; DÍAZ; ESQUIVEL, 2003).

Na Nigéria, levando em conta o alto número de portadores de *Taenia* spp. (8,6%) e alta prevalência de epilepsia (37 a cada 1000 habitantes), é sabido que a cisticercose humana está presente. Antes de 1960, foi observada alta frequência de epilepsia no Congo com a presença de metacestódeos acima de 3% na população. Em Camarões a prevalência

da cisticercose limita-se entre 0,7 e 2,4%, porém, a soroprevalência na África chega até 38% em algumas regiões (ZOLI et al., 2003).

Na Ásia, enquanto que em alguns países como Japão e Singapura a doença praticamente desapareceu devido ao progresso econômico, países mulçumanos chegaram ao mesmo resultado através de práticas religiosas, mas há diversos relatos de pacientes com cisticercose provenientes de países como Índia, China, Indonésia, Tailândia, Coréia, Taiwan e Nepal, sendo claros indicadores de disseminada prevalência da cisticercose nesse continente. Estudos de soroprevalência indicaram altas taxas de exposição no Vietnã, China, Coréia e Indonésia, com valores entre 0,02 – 12,6% (RAJSHEKHAR et al., 2003).

Estudos sorológicos no México revelaram taxa de infecção de 4,9 – 12,2% para cisticercose humana (FLISSER et al., 2003) e na área rural, a prevalência da NC foi de 9,1% determinada por TC (FLEURY et al., 2006). No Peru, a taxa de infecção encontrada nos humanos variou 5 – 24% (FLISSER et al., 2003; MONTANO et al., 2005). A taxa de infecção na Bolívia atinge 22,6%, no Equador 10,4%, e na Guatemala a cisticercose humana acomete 10 – 17% da população (FLISSER et al., 2003).

No Brasil, a soroprevalência da NC, não considerando as comunidades indígenas, variou de 29,4 – 64%, com uma média de 7,04%. Dividindo-se em regiões, a soroprevalência foi maior na região centro-oeste com média de 23,14% (5,2 – 41,02%), seguida pela região norte-nordeste com 4,06% (1,9 – 6,22%) e a região sul-sudeste com 1,8% (0,68% - 3,2%), e em relação a achados clínicos e de necropsia, a frequência de NC variou de 0,03 a 13,4% e de 0,12 a 9%, respectivamente (AGAPEJEV, 2003).

Em Uberlândia, Minas Gerais, Costa-Cruz et al. (1995) investigaram a frequência de cisticercose humana através de 3.937 ocorrências de necropsias, no período de 1971 a 1993, no serviço de anatomia patológica do Hospital de Clínicas da Fundação de Assistência, Estudo e Pesquisa de Uberlândia. A análise de 2.862 registros de laudos que estavam completos e com idade acima de um ano revelou 39 casos (1,4%) de cisticercose. Destes, 82,1% dos casos eram do Estado de Minas Gerais, 15,4% de Goiás e um caso (2,5%) não foi possível identificação. Dos 39 casos 35 (89,7%) apresentaram comprometimento do SNC.

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

assim a endemicidade da cisticercose na população amostrada e a problemática do complexo teníase-cisticercose na região.

No Brasil, a cisticercose relacionada à epilepsia foi encontrada em Florianópolis, SC (19,2%), Chapecó, SC (24%), Recife, PE (8,8%) e Mulungu do Morro, BA (15,3%). A doença foi encontrada em 3,3% das autópsias realizadas em Uberaba, MG e em 1,6% das realizadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (TREVISOL-BITTENCOURT; SILVA; FIGUEREDO, 1998; LINO-JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 1999; VALENÇA; VALENÇA, 2000; GOMES et al., 2002; FAÇANHA, 2006).

Entre os pacientes com sintoma de epilepsia, 85% vivem em regiões tropicais, e o desenvolvimento da epilepsia se deve há inúmeros fatores, como problemas pré-natais, traumatismo craniano e parasitoses do SNC. A NC é a principal causa de epilepsia adquirida de início na vida adulta em áreas endêmicas, mesmo em pacientes apresentando somente lesões calcificadas, pois todas as fases de evolução do cisticerco (viável, coloidal e calcificado) se associam com crises epiléticas (NASH et al., 2008; CAROD-ARTAL, 2009). Relatos em vários países das Américas do Sul e Central demonstraram existir associação de 30% entre todos os casos de crise convulsiva e NC. Na Índia, mais de 50% dos pacientes com desordens convulsivas tem evidência sorológica de cisticercose (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; HAWK et al., 2005).

Apesar dos dados de frequência da NC disponíveis, obstáculos interferem na determinação precisa de sua prevalência, incluindo a falta de sistemas epidemiológicos padronizados e compreensíveis, limitações intrínsecas aos estudos imunológicos atuais, alto custo de estudos de NI em comunidades rurais, e presença de pacientes assintomáticos com NI compatível com NC. Assim, a real prevalência da doença e a carga parasitária são subestimadas (RAMÍREZ-ZAMORA; ALARCÓN, 2010).

A cisticercose foi declarada erradicável pela Força Tarefa Internacional para Erradicação de Doenças (FTIED) em 1993, e está listada pelo OMS entre as 17 doenças tropicais negligenciadas e zoonoses negligenciadas potencialmente erradicáveis (MKUPASI et al., 2013). Em 2003, a FTIED revisou o status da cisticercose e verificou que o controle ou eliminação de *T. solium* não foi ainda demonstrado. Com o reconhecimento do crescimento global do problema da cisticercose, a Assembleia Mundial de Saúde (AMS) considerou a implantação do controle da NC em 2003. A AMS recomendou que as autoridades devessem ser fortemente encorajadas para instalar inspeção

nacional e sistemas de notificação, e adotar métodos mais ativos de prevenção e controle da cisticercose (FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Embora o desenvolvimento generalizado de infraestrutura sanitária e práticas de criação animal poderiam finalmente erradicar *T. solium*, esta não é uma realidade a curto prazo nas áreas endêmicas mais rurais. Entretanto, intervenções eficazes, acessíveis e sustentáveis em nível local e regional são urgentemente necessários para reduzir a carga imediata de doença. O progresso na coordenação regional é evidente através da formação de grupos de trabalho regionais, e avanços no diagnóstico e tratamento são esperados. No entanto, os avanços técnicos de todas as fontes devem ser continuamente traduzido em projetos de controle de operação para tratar danos em curso. O Grupo de Trabalho em Cisticercose no Peru fornece um excelente modelo, uma vez que continua a expandir as operações de campo e os progressos para a eliminação no norte do Peru (O'NEAL; WINTHROP; GONZALEZ, 2011).

1.1.7. Medidas de controle e prevenção

Devido às dificuldades de tratamento da NC, busca-se a implantação de medidas de controle. Entretanto, para estratégias de controle, indivíduos com NC não são os alvos essenciais (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). Pawlowski (2008) propõe uma intervenção para redução da teníase e NC que pode ser empregada fácil e rapidamente através dos serviços médico e veterinário usando uma quimioterapia foco-orientada da teníase. A melhora da criação de suínos domésticos e infraestrutura sanitária para evitar o acesso dos animais às fezes humanas e a defecação humana indiscriminada em lugares abertos também têm mostrado serem úteis no controle desta parasitose. Altos padrões da inspeção de carne e apropriado descarte de carcaças suínas infectadas também auxiliam (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

A educação parece ter efeito em aprimorar o conhecimento da doença, mas pouco efeito na mudança dos comportamentos de risco (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). O fator econômico facilita o sucesso do controle da doença, desde que as pessoas aprendam que suínos livres desta infecção podem ser vendidos por preços mais altos (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Outros dois principais fatores a serem considerados na implantação de intervenções de controle são: aceitação cultural e custo (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). A

maioria dos países desenvolvidos controlou o parasito como consequência do processo de desenvolvimento (GONZALEZ et al., 2003).

A vacinação representa uma ferramenta adicional no controle e prevenção do complexo teníase/cisticercose. Várias vacinas totais ou de subunidades foram testadas com efeitos protetores promissores contra cisticercose por *T. solium* e *T. saginata* (LIGHTOWLERS, 2006). A vacinação dos hospedeiros intermediários de *T. solium* pode remover a fonte da teníase humana, e indiretamente afetar o aparecimento de novos casos de cisticercose (FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006). Os antígenos TSOL18 e TSOL45-1A, localizados na superfície de oncosfera de *T. solium* (MARTINEZ-OCANÑA et al., 2011), foram utilizados em composições vacinais para controle da cisticercose suína, com valores de proteção 100% e 97%, respectivamente (FLISSER et al., 2004; LIGHTOWLERS, 2006). Sendo que a proteína recombinante TSOL18 testada junto com outra proteína recombinante, TSOL16, reduziu em 99,7% o número total de metacestódeos e em 99,9% o número de metacestódeos viáveis em suínos imunizados (JAYASHI et al., 2012).

Outra vacina com potencial aplicação para o controle da cisticercose é a S3Pvac, e suas variações (HUERTA et al., 2001; MANOUTCHARIAN et al., 2004; SCIUTTO et al., 2007; SCIUTTO et al., 2013). A S3Pvac é composta por três peptídeos, KETc12 (8 aminoácidos), KETc1 (12 aminoácidos) e GK1 (18 aminoácidos), já foi comprovada sua capacidade protetora em modelo animal de cisticercose murina com *T. crassiceps*, em suínos experimental e naturalmente infectados, em hamsters infectados com tenídeos e em cisticercose experimental em coelhos (SCIUTTO et al., 2007; RASSY et al., 2010; BETANCOURT et al., 2012). Essa vacina também foi testada em uma segunda versão, expressando os peptídeos em fagos filamentosos, reduzindo a frequência da infecção em 87% e também o número de metacestódeos (MANOUTCHARIAN et al., 2004).

1.2. Modelo experimental de cisticercose murina

T. crassiceps, descrita por Zeder em 1800, é um tenídeo que infecta raposas, lobos e cães, e infecções naturais com metacestódeos foram relatados nos seguintes roedores: *Microtus arvalis*, *Marmota monax* e *Peromyscus* sp. (WILLMS; ZURABIAN, 2010). O modelo experimental para o desenvolvimento do estágio larvário de *T. crassiceps* em camundongo BALB/c foi selecionado por ser um modelo de laboratório relativamente

simples (SCIUTTO et al., 1990). O cisticerco de *T. crassiceps* tem a capacidade de multiplicar-se assexuadamente através de brotamento, gerando uma carga parasitária maciça na cavidade peritoneal de camundongos como vesículas visíveis, proporcionando, assim, uma medida precisa da carga parasitária. Além disso, *T. crassiceps* não parasita os seres humanos (WILLMS; ZURABIAN, 2010; SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011). Suscetibilidade à infecção por *T. crassiceps* difere entre linhagens de camundongos, sendo alta a suscetibilidade de fêmeas da linhagem BALB/c (SCIUTTO et al., 1990). Essas vantagens tornam a cisticercose experimental murina um modelo para testes de compostos vacinais no controle da cisticercose (SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011). Adicionalmente, a reação cruzada existente entre antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*, torna o modelo murino uma escolha plausível para testar antígenos candidatos para vacinação contra cisticercose por *T. solium* (WILLMS; ZURABIAN, 2010; SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011). As principais vacinas testadas no modelo murino de cisticercose estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais estudos de proteção na cisticercose experimental murina.

Vacina	Taxa de Proteção	Autor
NC-1 peptídeo sintético	74%	Capelli-Peixoto et al., 2011.
Peptídeo sintético GK-1	64,7% a 96%	Fragoso et al., 2011.
Cisteína proteases de <i>Taenia solium</i>	72%	Baig et al., 2006.
pVAX-S-deltaC-3n	83%	Wu et al., 2005.
Paramiosina (VW2-1)	48%	Solís et al., 2005.
pcDNA3-cC1 DNA vacina	73,3%	Wang et al., 2003.
Tso18 DNA sequência	81,4%	Rosas et al., 2002.
Paramiosina (TPmy)	52%	Vázquez-Talavera et al., 2001.
KETc1 e KETc12 peptídeos sintéticos	KETc1: 66,7% a 100%. KETc12: 52,7% a 88,1%	Toledo et al., 2001.
Antígeno KETc7 expresso na superfície do fago M13 (PIgphage) e como peptídeo livre (PT1)	Pigphage: 57%. PT1: 50%	Manoutcharian et al., 1999.
GK-1	40 a 70%	Toledo et al., 1999.

1.3. Exposição de peptídeos em bacteriófagos

Desde a sua descrição por Smith (1985), a tecnologia de *phage display* (exposição de biomoléculas em fagos) tem apresentado utilização cada vez mais crescente em diversas áreas da ciência. Bacteriófagos ou simplesmente fagos são vírus que infectam uma variedade de bactérias gram-negativas, usando pilus sexual como receptor (PETTY et al., 2006). As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *Escherichia coli* via pilus F, consistem de fita simples de DNA incluso em uma cápsula proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 1) (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2000).

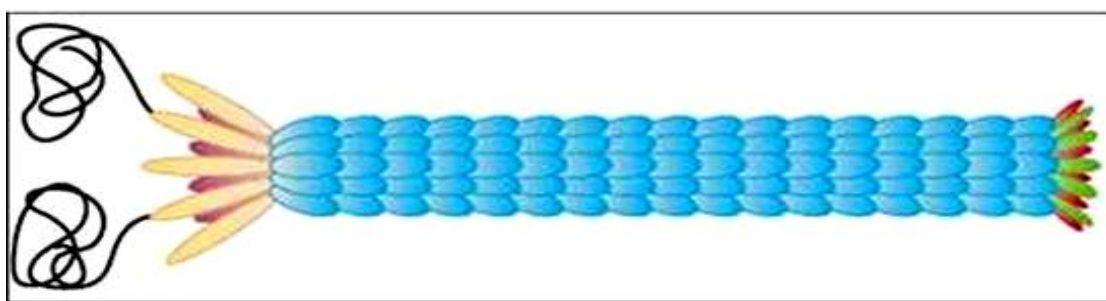


Figura 1. Estrutura de fago filamentososo. Visualiza-se um peptídeo (filamento preto) fusionado na proteína pIII (amarelo). As outras proteínas constitutivas do fago são: pVI (rosa), pVII (vermelho), pIX (verde) e pVIII (azul). Adaptado de Smothers; Henikoff; Carter (2002).

O *phage display* é um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma (AZZAZY, HIGHSMITH, 2002), sendo possível estabelecer a correlação entre cada sequência de proteína e sua respectiva sequência de DNA (ADDA et al., 2002). No sistema de *phage display*, as sequências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de modo que a proteína codificada seja expressa na superfície do fago como um produto de fusão a uma das proteínas de sua superfície, usualmente com pVIII ou pIII (AZZAY; HIGHSMITH Jr., 2002; PETTY et al., 2006; BRATKOVIC, 2010).

Uma grande possibilidade do *phage display* é a conveniência de selecionar somente os ligantes alvo-específicos. Essa ampla utilização se deve a algumas vantagens: habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, possibilidade de produzir proteínas solúveis, baixo custo, fácil manuseio e rapidez (SMITH; PETRENKO, 1997).

Biblioteca de fagos é uma mistura heteróloga de diversos clones de bacteriófagos. Cada clone possui um fragmento de DNA com uma sequência diferente de nucleotídeos, e assim, expõe diferentes peptídeos na sua superfície (MATSUMOTO et al., 2010). O procedimento de seleção biológica ou *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos em fagos contra o alvo. Os fagos contendo peptídeos com afinidade pelo alvo são capturados, caracterizados por sequenciamento, e submetidos a ensaios imunológicos (Figura 2) (SERGEEVA et al., 2006).

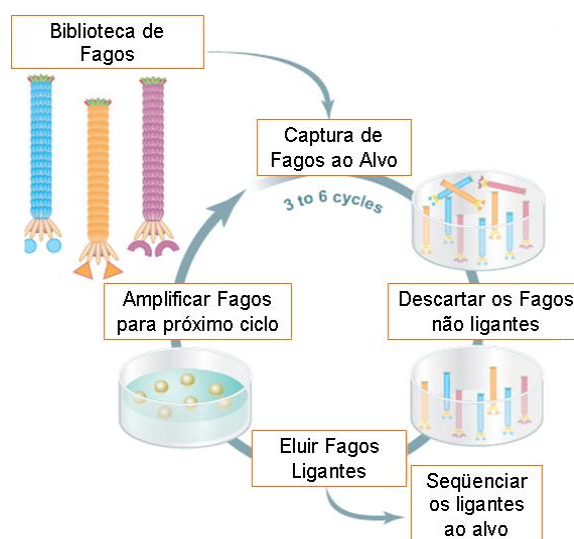


Figura 2. Ciclo de *Biopanning*. Em cada ciclo, os fagos ligantes ao alvo são selecionados, sendo os demais descartados. Os fagos ligantes são amplificados e seguem para novos ciclos com intuito de aumentar a afinidade de ligação ao alvo específico. Adaptado de Smothers; Henikoff; Carter (2002).

A biblioteca de peptídeos randômicos pode ser utilizada no estudo da interação anticorpo-antígeno (SERGEEVA et al., 2006; MAYROSE et al., 2007; FENG et al., 2009). A principal vantagem desta técnica é a ligação direta e de elevada especificidade que ocorre entre a superfície do fago e a molécula alvo. Assim, é possível realizar a seleção de epítomos e mimotopos com potencial para serem usados como antígenos vacinais ou no imunodiagnóstico de várias doenças, mesmo sem o prévio conhecimento de tais antígenos. (YANG et al., 2005; MAYROSE et al., 2007). Existem vários estudos que demonstram a utilidade do *phage display* para seleção de peptídeos candidatos à vacinas para diferentes patologias infecciosas (TANG et al. 2004; PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010; CUI et al., 2013).

Apesar de *T. solium* causar uma importante doença parasitária em humanos e suínos, incluindo um sério problema neurológico que é a NC, este patógeno não é extensivamente caracterizado no nível molecular, e o diagnóstico desta helmintíase continua sendo um desafio na prática médica (ROBLES et al., 2005). Em 1999, Manoutcharian et al. conseguiram identificar epítomos de anticorpos presentes no LCR através da construção de uma biblioteca gênica utilizando a técnica do *phage display*. Estes autores relataram a seleção de peptídeos por *phage display* como uma ferramenta para o desenvolvimento de um teste de imunodiagnóstico mais simples e sensível e no entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese da NC. Buscou-se também a utilização de antígenos alternativos no método de *phage display*, como o isolamento de antígenos de *T. crassiceps* em biblioteca de cDNA por Robles et al. (2005) e sua utilização na identificação de antígenos para o reconhecimento de anticorpos em amostras clínicas de pacientes com NC. Esta também foi utilizada para análise da homologia de sequências de peptídeos selecionados de bibliotecas com pacientes com NC e sem NC. Dois tipos diferentes de sequências foram obtidos e distinguidos como “NC-relacionada” e “NC-não relacionada”. Este tipo de análise pode permitir a identificação de doença quando os testes imunológicos são negativos (GAZARIAN et al., 2001). Essa metodologia no diagnóstico imunológico da NC foi explorada por Da Silva Ribeiro et al. (2010), obtendo-se mimotopos altamente específicos e sensíveis, alcançando em alguns casos 100% de sensibilidade, e diminuindo casos de reatividade cruzada, principalmente com *Echinococcus granulosus* e outros parasitos filogeneticamente relacionados à *T. solium*.

Esta metodologia utilizada na geração de antígenos derivados de *T. solium* pode prover informação útil não só para o diagnóstico da NC, mas também para monitoramento do paciente durante o tratamento, isolamento de antígenos do parasito circulantes no hospedeiro, em estudos da interação parasito-hospedeiro, e identificação de antígenos candidatos a vacinas (ROBLES et al., 2005). A viabilidade da utilização de fagos para a vacinação de suínos contra a cisticercose foi testada, e resultados preliminares apontaram para a capacidade protetora da vacina de fagos contra cisticercose suína com 54% na redução da doença e 87% de diminuição no número de cisticercos estabilizados (MORALES et al., 2008). Mais recentemente, a tecnologia do *phage display* foi utilizada no mapeamento de epítomos no antígeno TSOL 18 (GUO et al., 2010), demonstrando que esta ferramenta molecular tem potencial para selecionar epítomos de interesse tanto de diagnóstico como para o desenvolvimento de vacinas.

Em estudo realizado anteriormente (MANHANI, 2009), foram isolados mimotopos de metacéstódeos de *T. solium* a partir da realização de *biopanning* utilizando IgY anti-metacéstodeo de *T. solium*. A IgY, obtida através da imunização de galinhas com extrato salino de metacéstódeos de *T. solium*, foi adsorvida em poços de microplacas para selecionar peptídeos a partir de uma biblioteca de fagos filamentosos. Os mimotopos selecionados foram testados para o diagnóstico de NC através de ensaio de ELISA com amostras de soro, e sete mimotopos (Cc6, Cc8, Cc25, Cc27, Cc30, Cc45 e Cc48) apresentaram resultados satisfatórios no imunodiagnóstico da NC, e também foram capazes de diferenciar a forma ativa da forma inativa de NC, detectando aproximadamente 100% dos pacientes com a forma inativa, e a especificidade variou de 85,7% a 94,3%. Esses resultados foram animadores e levantaram a dúvida se esses peptídeos teriam algum efeito protetor ou acelerador na resolução da NC. Assim, será testada a hipótese do mimotopo Cc48, reconhecido por anticorpos de pacientes na fase inativa da NC, ter a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes para o controle da cisticercose murina durante a fase inicial, ou mesmo acelerar o processo de calcificação dos metacéstódeos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a proteção induzida pela imunização com peptídeos expressos em fagos selecionados pela técnica de *phage display* e peptídeos sintéticos em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Taenia crassiceps*.

2.2. Objetivos Específicos

- Imunizar camundongos Balb/c com os peptídeos, expresso em fagos e sintético.
- Avaliar a eficácia de proteção induzida nos animais imunizados com os peptídeos, expresso em fagos e sintético, e posteriormente desafiados com metacestódeos de *T. crassiceps*.
- Avaliar o perfil da resposta imune em camundongos induzido pela imunização com os peptídeos, expresso em fagos e sintético.
- Avaliar a avidez dos anticorpos IgG produzidos 60 dias após a infecção.
- Verificar a ligação dos anticorpos IgG à metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Locais de desenvolvimento

Esse trabalho foi executado em colaboração entre os Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses e Laboratório de Nanobiotecnologia, ambos na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com parceria da Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Centro-Oeste (UFSJ-CCO).

Na UFSJ-CCO foram realizados os seguintes procedimentos: amplificação do bacteriófago Cc48, manutenção dos animais durante o experimento, imunização e desafio dos animais, ELISA para detecção dos anticorpos, ELISA-avidez.

Nos laboratórios da UFU, realizaram-se os seguintes procedimentos: seleção do bacteriófago Cc48, manutenção da cepa de *T. crassiceps*, ELISA das citocinas.

3.2. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais (CEPEA), da Universidade Federal de São João Del Rei, sob o nº 43/2010, intitulado "Avaliação de peptídeos no controle da cisticercose" (ANEXO I). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal (CIOMS, 1985).

3.3. Peptídeo expresso em fago selecionado por *phage display*

O mimotopo Cc48 expresso em bacteriófago M13, foi previamente selecionado por *phage display* contra anticorpos IgY anti-metacestódeos de *T. solium*, produzidos e purificados a partir de soro de galinhas imunizadas com extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (MANHANI, 2009). Esse mimotopo foi selecionado para o ensaio de imunização por ter apresentado os melhores resultados no imunodiagnóstico diferencial de NC (MANHANI et al., 2011). Esse fago foi reamplificado em 20 ml de cultura de *Escherichia coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento (OD600=0,3), em meio de cultura contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador orbital com temperatura a 37° C. A cultura foi transferida para um tubo Oakridge (Hitachi,

50 ml) e centrifugada (10 min, 10.000 rpm). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para outro tubo e recentrifugado, e 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M, água), e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4° C. No dia seguinte, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o tubo recentrifugado brevemente, para remoção total do sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de solução tamponada de tris (TBS, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos, 10.000 rpm à 4° C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada (10 min, 14.000 rpm, 4° C). O sobrenadante foi descartado e a centrifugação repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TBS, obtendo-se então o bacteriófago amplificado, denominado como mCc48 (MANHANI, 2009). Foi feito o pedido de depósito de patente da sequência do peptídeo selecionado sob o título: “Peptídeos Marcadores das Fases Clínicas da Neurocisticercose” (ANEXO II).

3.4. Peptídeo sintético

O peptídeo expresso na proteína pIII do mimotopo Cc48 foi otimizado por bioinformática, para melhor adequar à provável estrutura, sintetizado por empresa especializada e utilizado conforme instruções do fabricante. A versão sintética incluiu duas repetições da sequência peptídica de 12 aa intercaladas por uma sequência espaçadora com quatro aminoácidos (Gli-Gli-Gli-Ser) e a carboxila da região carbóxi-terminal do peptídeo sintético recebeu uma amida para bloquear a formação de carga negativa. O peptídeo sintético foi denominado sCc48.

3.5. Animais

Fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c infectadas com metacestódeos de *T. crassiceps* foram, primeiramente, obtidas por doação junto ao Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Química da

Universidade de São Paulo, e posteriormente, o ciclo de vida foi mantido no biotério de manutenção de animais da Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Centro-Oeste. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum*, sob condições de temperatura e umidade apropriadas e ciclo claro-escuro de 12 horas.

3.6. Imunização

O esquema de imunização foi padronizado utilizando as informações de outros trabalhos disponíveis na literatura. Baseou-se em uma inoculação do composto, seguido por quatro reforços, em intervalos de doze dias. A primeira imunização (dia 0) foi realizada com a inoculação do material junto com adjuvante completo de Freund (1:1, v/v) por inoculação subcutânea, e os reforços (12, 24, 36 e 48 dias após a imunização) foram administrados com adjuvante incompleto de Freund por via intradérmica (1:1, v/v).

Para imunização do G1 utilizou-se o bacteriófago mCc48 inativado por radiação ultravioleta (SAMOYLOVA et al., 2012) diluído em PBS estéril em uma concentração final de 2×10^{10} partículas por animal, em um volume final de 200 μ l. No caso do G2, empregou-se o peptídeo sintético (sCc48) diluído em PBS estéril na concentração de 50 μ g por animal, em um volume final de 200 μ l. Para G3 e G4 fez-se o uso de inoculação somente com PBS estéril, em um volume final de 200 μ l por animal.

Posteriormente, fêmeas de 5 a 7 semanas de idade foram inoculadas via intraperitoneal com 10 metacestódeos de *T. crassiceps* em 1 ml de solução de tampão fosfato estéril (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 12 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, pH 7.4). Os animais foram divididos em 4 grupos:

- Grupo 1 (G1, n = 40): imunizados com peptídeo expresso em fagos (mCc48) e desafiados com metacestódeos de *T. crassiceps*;
- Grupo 2 (G2, n = 40): imunizados com peptídeo sintético (sCc48) e desafiados com metacestódeos de *T. crassiceps*;
- Grupo 3 (G3, n = 40): não imunizados e desafiados com metacestódeos de *T. crassiceps*;
- Grupo 4 (G4, n = 40): animais não imunizados e não desafiados com metacestódeos de *T. crassiceps*.

3.7. Dados parasitológicos

Para determinação da carga parasitária, doze dias após o último reforço os animais foram desafiados com dez metacestódeos de *T. crassiceps* em 1ml de PBS estéril por via intraperitoneal. Foram determinados quatro pontos de coletas: 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação dos parasitos (dpi). Os dados analisados foram: peso, circunferência abdominal, tamanho do corpo sem cauda, tamanho total do corpo, e contagem de metacestódeos nos pontos determinados. Para tanto, dez animais em cada um dos pontos (15, 30, 45 e 60 dpi) foram sacrificados, após anestesia profunda com tiopental sódico (injeção intraperitoneal). A cavidade peritoneal foi aberta e os metacestódeos foram retirados, colocados em PBS, contados sob microscópio estereoscópico e classificados como viáveis ou calcificados. Amostras de sangue foram coletadas em cada ponto de sacrifício (15, 30, 45 e 60 dpi) sendo parte delas reservadas para contagem de leucócitos e outra para obtenção de soro para os testes imunológicos. As amostras de sangue reservadas para obtenção do soro, foram centrifugadas e o soro obtido foi armazenado separadamente em alíquotas a – 20°C até o momento do uso.

3.8. Dosagem de anticorpos específicos

Para determinar as condições ótimas da reação, experimentos preliminares foram conduzidos através de titulação em bloco dos antígenos, soros e conjugados. Os níveis de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA e IgE) foram dosados nos quatro grupos de animais por ELISA. Para determinação dos anticorpos no G1 utilizou-se o bacteriófago mCc48. O peptídeo sintético sCc48 foi utilizado para a detecção de anticorpos no G2. O extrato total de metacestódeo de *T. crassiceps* (VAZ et al., 1997) foi utilizado para dosagem de anticorpos no G3, que produziu os parâmetros de uma infecção normal. O G4 foi utilizado como controle negativo para todos os outros grupos. A análise foi realizada separadamente para cada grupo.

Para o G1, as placas de microtitulação de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com mCc48 (10^{10} partículas/poço) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6, 0,2M) e incubadas por 16h a 4°C. Depois as placas foram lavadas seis vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T), em lavadora automática de placas (TP-Washer, Thermoplate, Brasil), em seguida, os poços foram bloqueados com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM),

durante 30 min a 37° C. Após novas lavadas, as amostras de soro diluídas em PBS-TM foram adicionados na placa nas seguintes diluições: 1:200 para detecção de IgM e IgG, 1:100 para IgA e 1:50 para IgE, e incubadas a 37°C por 1h. Em seguida, repetiu-se a lavagem com PBS-T por três vezes. Os conjugados anti-IgM, anti-IgG e anti-IgA possuíam marcação com peroxidase, e foram adicionados na diluição 1:1500, sendo incubados por 1h a 37°C. A reação subsequente para IgM, IgG e IgA foi feita pela adição da solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD) com H₂O₂. Após 15 minutos à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de solução de H₂SO₄ 2M. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (TP-Reader, Thermoplate, Brasil).

Para a reação ELISA IgE, o anticorpo biotilado anti-IgE foi adicionado e incubado por 2 horas a 37°C, seguido por um ciclo de lavagem, e adição de estreptavidina-peroxidase (1:1000) que foi incubado por 30 minutos a 37°C. Após último ciclo de lavagem a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) com H₂O₂, e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em seguida, a reação foi interrompida, pela adição de H₂SO₄ 2M. A densidade óptica foi determinada em leitor de ELISA utilizando filtro de 450 nm para IgE.

Os procedimentos para sCc48 e o antígeno total de metacésteo de *T. crassiceps* foram os mesmos descritos anteriormente, variando as diluições de soro e conjugados. No caso do sCc48, as placas foram sensibilizadas com o peptídeo na concentração de 10 µg/poço diluído em tampão carbonato-bicarbonato, as diluições do soros foram 1:200 para IgM, 1:100 para IgG e IgA e 1:10 para IgE, e os conjugados seguiram as seguintes diluições, 1:1000 para IgM, IgG e IgA, e 1:100 para IgE. Nos procedimentos utilizando o antígeno total de metacésteo de *T. crassiceps*, a sensibilização foi com 10 µg/poço, os soros foram diluídas a 1:500 para IgM, IgG e IgA e 1:50 para IgE, e os conjugados 1:200 para IgM, IgG e IgA, e 1:100 para IgE.

O resultado foi expresso em índice ELISA, e para tanto o *cut-off* (CO) foi calculado como sendo a soma das médias ($\bar{X}$) dos valores de densidade óptica (DO) dos soros dos animais do G4 mais 2 vezes o desvio padrão (DP) ($CO = \bar{X} + (2DP)$), e o índice ELISA (IE) pelo valor de DO obtido dividido pelo *cut-off* ($IE = DO/CO$).

3.9. ELISA Avidéz

O teste de ELISA avidéz baseou-se no estudo de Manhani et al. (2009). Resumidamente, microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com bacteriófago mCc48 (10^{10} partículas/poço), peptídeo sintético sCc48 (10 µg/poço), e antígeno total de metacestódeo de *T. crassiceps* (10 µg/poço), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6, 0,2M) e incubadas por 16h a 4°C. Em seguida realizou um ciclo de lavagem com PBS-T, em lavadora automática, e as placas foram bloqueadas com PBS-TM, durante 30 min a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, foram testados os soros obtidos no ponto 60dpi, na diluição de 1:100 em PBS-TM, dos grupos G1 (bacteriófago mCc48), G2 (peptídeo sintético sCc48) e G3 (*T. crassiceps*), e 3 amostras do grupo G4 como controle negativo da reação. Os soros foram adicionados em quadruplicata e incubados durante 1h a 37°C. Após a incubação, metade dos soros foram tratados com solução de ureia 6M durante 20 min, à temperatura ambiente, a outra metade foi incubada com PBS-T pelo mesmo período de tempo. Em seguida, a placa foi lavada três vezes, e adicionou-se o conjugado específico para IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-TM e incubou-se durante 1h a 37°C. Após último ciclo de lavagem a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático OPD com H₂O₂, e incubação por 15 minutos a TA e ao abrigo da luz, em seguida, a reação foi interrompida, pela adição de H₂SO₄ 2M. Os valores de DO foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA.

O *cut-off* foi calculado pela soma das médias DO dos soros dos animais do G4 mais 2 vezes o desvio padrão, e o IE pelo valor de DO obtido dividido pelo *cut-off*. A avidéz de IgG foi expressa como índice de avidéz (IA), sendo $IA = (\text{média IE dos poços tratados com ureia} / \text{média IE dos poços sem ureia}) \times 100$. Considera-se alta avidéz acima de 68% de IA, avidéz intermediária com valores de IA entre 64% e 68%, e baixa avidéz abaixo de IA de 64% (MANHANI et al., 2009).

3.10. Dosagem de citocinas

A análise quantitativa das citocinas IFN-γ e IL-4 nas amostras de soro dos animais foi realizada por meio de ELISA utilizando kits disponíveis comercialmente (Abcam, Cambridge, EUA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante. Foram analisadas seis amostras aleatórias de G1 e G2, e cinco amostras aleatórias de G3 e G4, nos quatro pontos determinados para o sacrifício (15, 30, 45 e 60 dpi), juntamente com os controles positivos

e negativo fornecidos pelos kits. Os resultados foram expressos em picogramas de citocina/ml, com base no padrão fornecido com o kit.

3.11. Contagem de leucócitos

Amostras de sangue coletadas em cada ponto de sacrifício (15, 30, 45 e 60 dpi) foram utilizadas para contagem total de leucócitos, e os esfregaços sanguíneos foram confeccionados utilizando sangue da veia da cauda dos animais.

Para a contagem total de células, realizada em câmara de Neubauer, 20 µL de sangue foram diluídos em 380 µL de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi realizada em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa, segundo instruções do fabricante, sendo contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x.

3.12. Reação de imunofluorescência

A reação de imunofluorescência foi padronizada a partir de protocolos disponíveis na literatura. As formas metacestódeas de *T. crassiceps* e de *T. solium* foram incluídas em Tissue-tek (Tissue Freezing Medium, Durham, NC, EUA) e congelados a -70°C. Secções de 2 µm de espessura foram obtidas e os cortes foram colocados em lâminas para microscopia, que foram deixadas a TA por 30 min para secagem. Os soros dos animais foram diluídos 1:100 em PBS e incubados por 2 horas a 37°C com o corte. Após duas lavagens de 5 min cada em PBS, as lâminas foram deixadas secar a TA, e em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído 1:50 em solução de azul de Evans (1:25) por 1 hora a 37 °C. Após duas lavagens com PBS e secagem, as lâminas foram montadas utilizando glicerina tamponada e lamínula. A observação foi feita em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.13. Análise pelo BLAST

Foram feitas buscas no banco de dados *Protein BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool – http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) para

similaridade do peptídeo isolado Cc48 com proteínas de *T. crassiceps* e *T. solium* depositadas.

3.14. Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Mineo (2009).

3.15. Análise dos dados

O cálculo de proteção foi baseado na análise em Betancourt et al. (2012), e foi determinado em duas análises: 1) redução na carga parasitária, expressa em porcentagem, calculada da seguinte maneira: $[(\text{n}^\circ \text{ de metacestódeos no grupo 3} - \text{n}^\circ \text{ de metacestódeos no grupo vacinado}) / (\text{n}^\circ \text{ de metacestódeos no grupo 3}) \times 100]$; e 2) redução no número de animais infectados, através do seguinte cálculo $[(\text{total de animais analisados no grupo} - \text{n}^\circ \text{ de animais infectados}) / \text{total de animais no grupo} \times 100]$ (%). O primeiro parâmetro foi identificado com eficácia, e o segundo como proteção.

As análises estatísticas foram baseadas em frequências e porcentagens para variáveis qualitativas, e médias e desvios padrões para variáveis quantitativas. Para análise estatística foi utilizado programa computacional específico (*GraphPad Prism* versão 5.0). Comparações dos dados foram analisadas por análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey, ou seu correspondente não paramétrico Teste de Kruskal-Wallis. Testes de correlação foram executados através de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico, teste de correlação de Spearman. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Dados morfométricos

Os dados relativos as medidas morfométricas (peso, circunferência abdominal (C.A.), tamanho do corpo sem cauda (T.C.S.C.), tamanho do corpo total (T.C.T)) coletados nos dias de inoculação dos metacestódeos (desafio) e nos pontos de sacrifício estão apresentados na Tabela 2, e apresentados em média e desvio padrão (D.P.). Os dados completos dos animais de cada grupo estão amostrados no APÊNDICE I.

Tabela 2. Dados morfométricos dos animais nos pontos de desafio e nos pontos de sacrifício.

DESAFIO									
GRUPO	DPI	PESO (g)		CA (cm)		T.C.S.C. (cm)		T.C.T. (cm)	
		MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.
G1	15	24,60	1,27	8,85	0,24	10,55	0,37	19,65	0,58
	30	24,43	0,55	8,89	0,22	10,39	0,42	19,44	0,58
	45	24,11	1,10	8,75	0,26	10,60	0,32	19,40	0,39
	60	24,23	1,07	8,90	0,21	10,50	0,41	19,35	0,47
G2	15	24,38	1,28	8,50	0,62	10,00	0,58	19,10	0,52
	30	24,32	0,88	7,30	0,26	9,45	0,50	17,95	0,44
	45	24,42	0,96	7,10	0,32	9,35	0,47	18,15	0,63
	60	24,85	1,37	8,63	0,41	8,65	0,47	18,71	0,50
G3	15	24,49	1,94	8,80	0,63	10,25	0,35	19,65	0,67
	30	23,89	1,52	8,80	0,63	10,25	0,35	19,65	0,67
	45	25,01	1,33	7,35	0,41	10,25	0,26	19,65	0,67
	60	24,67	1,50	8,40	0,52	10,50	0,24	19,95	0,60
G4	15	25,19	1,57	8,83	0,35	10,78	0,26	19,83	0,43
	30	25,06	1,49	8,90	0,32	10,60	0,39	19,75	0,42
	45	24,73	1,87	7,55	0,60	10,20	0,35	19,50	0,53
	60	24,77	1,66	8,40	0,32	8,65	0,47	18,71	0,50
SACRÍFÍCIO									
GRUPO	DPI	PESO (g)		CA (cm)		T.C.S.C. (cm)		T.C.T. (cm)	
		MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.
G1	15	26,10	1,59	8,80	0,42	10,70	0,35	19,60	0,52
	30	27,57	2,80	9,17	0,71	10,67	0,35	19,78	0,44
	45	34,29	6,07	10,35	1,25	10,60	0,21	19,60	0,57
	60	43,18	4,28	11,55	0,50	10,65	0,34	19,25	0,63
G2	15	24,68	1,16	9,50	0,24	10,45	0,50	19,55	0,76
	30	25,77	1,42	8,60	0,99	10,50	0,47	18,90	0,57
	45	27,18	3,05	8,72	0,75	10,56	0,30	18,89	0,33
	60	24,92	1,65	8,90	0,57	9,75	0,26	19,55	0,50
G3	15	26,81	2,00	9,40	0,39	10,70	0,26	19,80	0,54
	30	29,08	2,55	10,40	0,88	10,80	0,35	19,90	0,46
	45	26,97	0,81	8,80	0,35	10,40	0,52	19,65	0,63
	60	27,23	2,83	9,35	1,03	10,10	0,61	19,90	0,66
G4	15	26,49	1,55	8,72	0,36	10,56	0,17	19,83	0,43
	30	27,03	1,09	8,85	0,47	10,80	0,42	20,00	0,53
	45	25,46	1,86	8,50	0,33	10,60	0,32	19,95	0,37
	60	25,51	1,64	8,35	0,63	10,10	0,39	20,60	0,61

DPI = dias após infecção

C.A. = circunferência abdominal

T.C.S.C. = tamanho corporal sem cauda

T.C.T = tamanho corporal total

4.2. Imunização

Na Figura 3, estão plotados os valores referentes às contagens de metacéstódeos e a comparação entre os grupos. Nessa figura é possível visualizar um aumento progressivo no número de metacéstódeos com o passar do tempo em G1 e G3, sendo que no ponto 60dpi (Figura 3D) o número de metacéstódeos recuperados no G1 ultrapassou de maneira significativa a quantidade encontrada no G3. No G2 houve pouca variação no número de metacéstódeos ao longo do experimento.

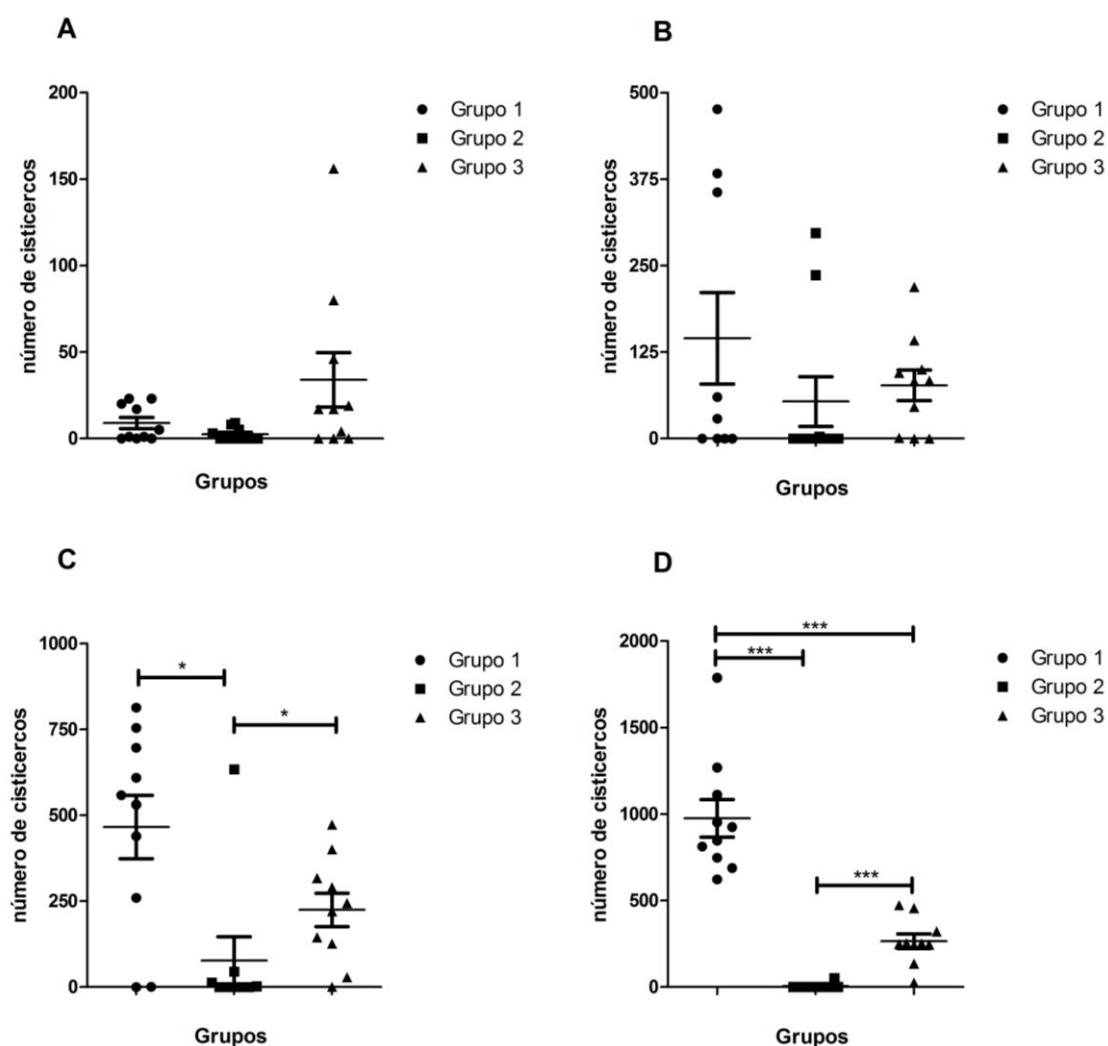


Figura 3. Contagem de metacéstódeos recuperados da cavidade peritoneal de camundongos fêmeas Balb/C, após imunização com bacteriófago Cc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2) ou PBS (G3), e desafio com metacéstódeos de *T. crassiceps*. A) ponto 15 dpi. B) ponto 30 dpi. C) ponto 45 dpi. D) ponto 60 dpi. dpi = dias após infecção. Linhas e barras transversais representando a média e o desvio padrão. Análise estatística pelo teste ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

O cálculo da proteção dos imunógenos utilizados foi baseado na presença ou ausência de desenvolvimento de metacéstódeos e no número de parasitos recuperados em G1 e G2, em comparação com os dados do G3. Os valores referentes à eficácia (redução da carga parasitária) e proteção (porcentagem de animais não infectados) conferidos pelas diferentes formulações do peptídeo testado, expresso em bacteriófago (mCc48 – G1) e com o peptídeo sintético (sCc48 – G2), estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio de proteção no modelo de cisticercose murina com diferentes apresentações do peptídeo Cc48.

Grupo	Ponto de análise	Nº de Animais	Carga parasitária individual (média ± Desvio Padrão)	Eficácia ^a %	Proteção ^b %
G1 (bacteriófago Cc48)	15 dpi	10	0, 5, 23, 0, 23, 1, 0, 17, 1, 20 (9 ± 10.4)	73,5	30,0
	30 dpi	9	60, 476, 356, 383, 29, 0, 0, 0, 0 (144.9 ± 198.6)	0,0	44,4
	45 dpi	10	696, 260, 439, 1, 0, 754, 558, 531, 813, 609 (466.1 ± 291.7)	0,0	10,0
	60 dpi	10	1788, 953, 1268, 925, 688, 1111, 813, 622, 747, 846 (976.1 ± 344.8)	0,0	0,0
G2 (peptídeo sintético sCc48)	15 dpi	10	0, 0, 0, 0, 0, 3, 0, 8, 9, 5 (2.5 ± 3.6)	92,6	60,0
	30 dpi	10	0, 0, 0, 0, 297, 0, 236, 3, 0, 0 (53.6 ± 113.1)	30,4	70,0
	45 dpi	9	633, 13, 0, 0, 0, 0, 2, 0, 45 (77.0 ± 209.0)	69,2	55,6
	60 dpi	10	0, 52, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 (5.2 ± 16.4)	98,0	90,0
G3 (PBS)	15 dpi	10	4, 0, 0, 156, 17, 0, 46, 19, 80, 17 (33.9 ± 49.8)		
	30 dpi	10	1, 142, 84, 46, 100, 0, 219, 0, 83, 95 (77 ± 69.9)		
	45 dpi	10	29, 473, 127, 245, 1, 317, 401, 145, 221, 290 (224.9 ± 152.8)		
	60 dpi	10	136, 250, 242, 246, 26, 322, 252, 474, 253, 457 (265.8 ± 132.9)		

^a Eficácia foi calculada como a redução da carga parasitária comparada aos valores do grupo G3.

^b Proteção foi calculada como a porcentagem de animais não infectados dentro de cada ponto analisado nos grupos G1 e G2.

O G1 apresentou redução da carga parasitária em comparação com o grupo G3 somente do ponto 15dpi, com uma eficácia de 73,5%, e uma taxa de proteção em relação ao número de animais infectados de 30,0% e 44,4% nos pontos 15dpi e 30 dpi, respectivamente. Nos outros pontos os animais apresentaram uma taxa de infecção superior ao G3.

O G2 apresentou os maiores valores de eficácia e proteção no ponto 60dpi, sendo 98% e 90%, respectivamente. Mesmos nos pontos onde os valores de eficácia e proteção foram menores ainda houve melhora em relação aos dados do G3.

Os metacestódeos recuperados em todos os animais eram em sua maioria viáveis (dados não amostrados).

4.3. Dosagem de anticorpos específicos

Os resultados dos ELISA revelaram a presença de todos os tipos de anticorpos dosados (IgM, IgG, IgA e IgE) em todos os grupos de camundongos. O G4, que representa o controle negativo, foi utilizado para calcular os IE dos diferentes tipos de anticorpos nos animais imunizados com o bacteriófago mCc48 (G1) ou peptídeo sCc48 (G2). O G3 foi utilizado como controle positivo em relação à produção de anticorpos durante a infecção. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4 a 7. O grupo G1 apresentou os maiores níveis de anticorpos IgM e IgG, e os níveis de IgA e IgE foram semelhantes aos do Grupo 3. O Grupo G2 apresentou os menores valores para todos os anticorpos.

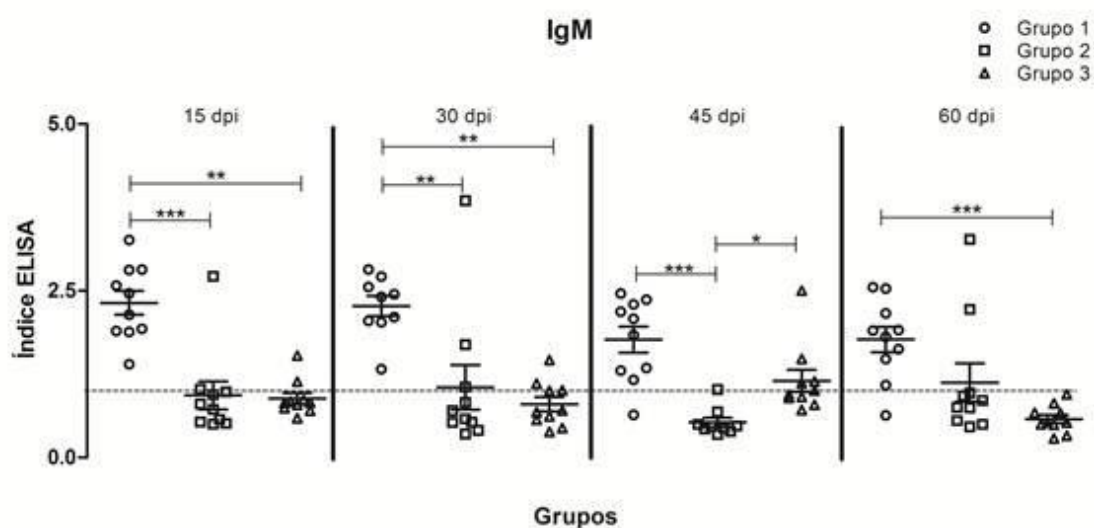


Figura 4. Detecção de anticorpos IgM por ensaio imunoenzimático (ELISA), no soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), e os dados dos animais do grupo G4 (controle negativo) foram utilizados para calcular o IE. Linhas e barras transversais representando a média mais o desvio padrão. Linha pontilhada representa o IE = 1,0. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. dpi = dias após infecção.

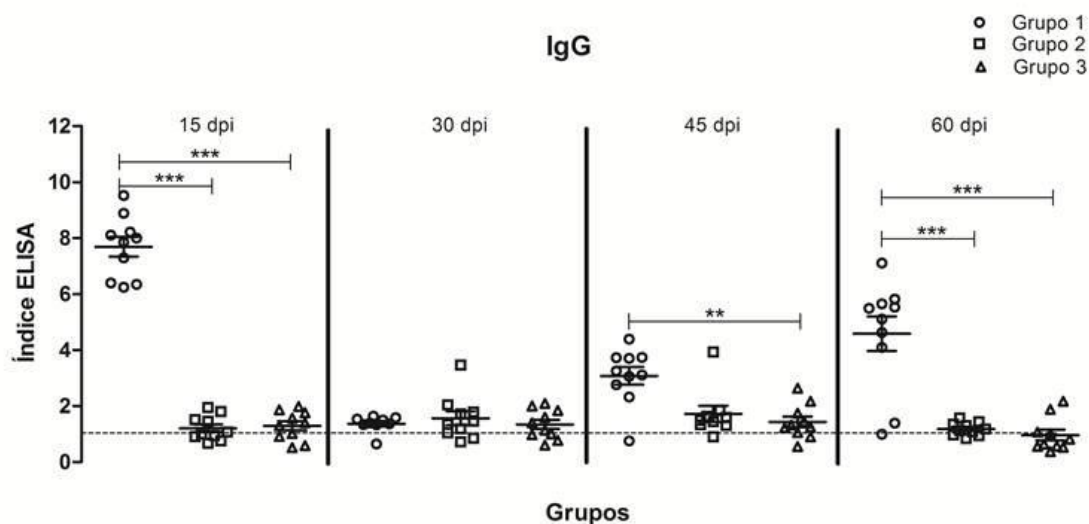


Figura 5. Detecção de anticorpos IgG por ensaio imunoenzimático (ELISA), no soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), e os dados dos animais do grupo G4 (controle negativo) foram utilizados para calcular o IE. Linhas e barras transversais representando a média mais o desvio padrão. Linha pontilhada representa o IE = 1,0. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. dpi = dias após infecção.

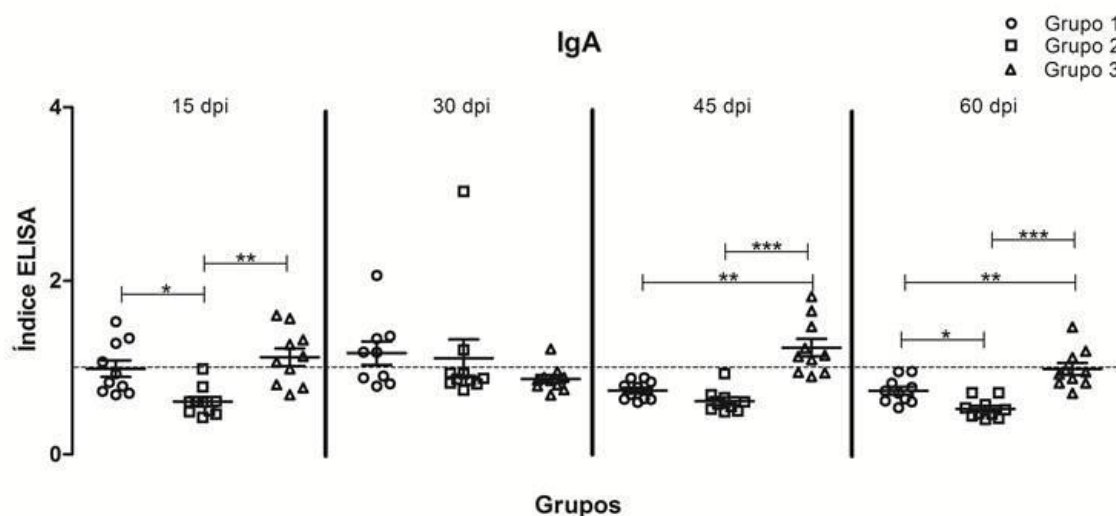


Figura 6. Detecção de anticorpos IgA por ensaio imunoenzimático (ELISA), no soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), e os dados dos animais do grupo G4 (controle negativo) foram utilizados para calcular o IE. Linhas e barras transversais representando a média mais o desvio padrão. Linha pontilhada representa o IE = 1,0. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. dpi = dias após infecção.

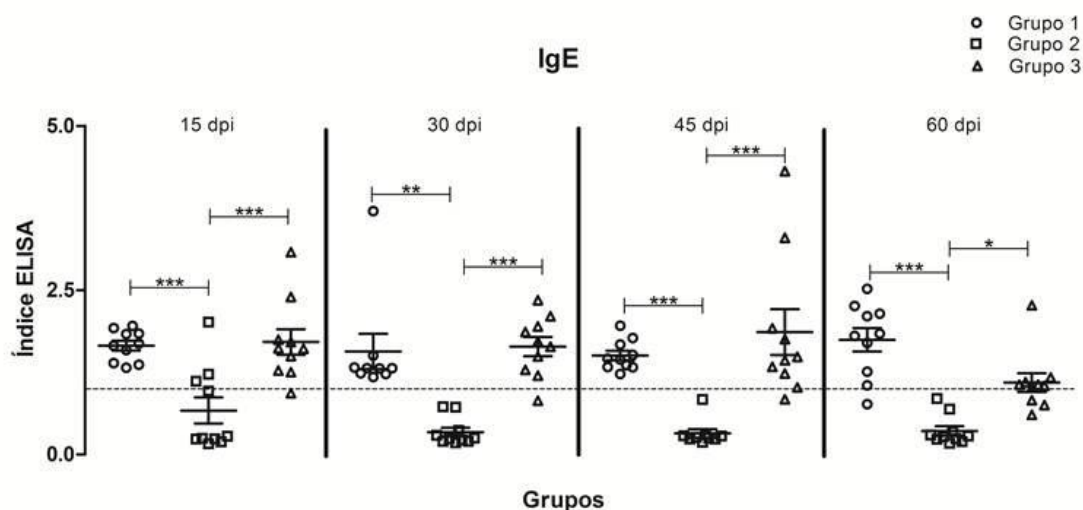


Figura 7. Detecção de anticorpos IgE por ensaio imunoenzimático (ELISA), no soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), e os dados dos animais do grupo G4 (controle negativo) foram utilizados para calcular o IE. Linhas e barras transversais representando a média mais o desvio padrão. Linha pontilhada representa o IE = 1,0. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. dpi = dias após infecção.

Analisando a produção de IgM no G1, não houve diferença estatística entre os quatro pontos de coleta, indicando uma produção constante durante os 60 dias de infecção. A produção de IgG apresentou diferença entre os pontos 15 dpi e 30 dpi ($p < 0,0001$), 15 dpi e 45 dpi ($p < 0,001$) e 30 dpi e 60 dpi ($p < 0,05$), juntamente com a análise do gráfico (Figura 5) pode-se verificar que no ponto 15 dpi houve detecção de IgG, que decresce no ponto 30 dpi e volta a aumentar nos pontos 45 dpi e 60 dpi.

Houve diferença estatística na análise de IgA entre os pontos 15 dpi e 45 dpi ($p < 0,05$) e 30 dpi e 60 dpi ($p < 0,05$), verifica-se que a produção de IgA foi maior nos pontos 15 dpi e 30 dpi, com diminuição no ponto 45 dpi e indetectável no ponto 60 dpi. Não houve diferença na captura de IgE entre os pontos analisados, mantendo-se alta durante todo o experimento.

Ao analisar em conjunto com os dados de produção de anticorpos com a recuperação de metacestódeos, é possível verificar que o ponto 15 dpi que apresentou os maiores valores de IgG no G1 corresponde ao ponto com menor número de metacestódeos recuperados, e consequentemente, o que apresentou a maior eficácia dentro desse grupo (73,5%).

Em relação aos dados do G2, não houve diferença entre os pontos avaliados em relação à detecção de IgM, IgG e IgE, mas houve para IgA entre os pontos 15 dpi e 30 dpi ($p < 0,05$), 30 dpi e 45 dpi ($p < 0,05$) e 30 dpi e 60 dpi ($p < 0,0001$). A detecção de IgG foi constante durante todo o experimento do G2, sendo que a maioria dos animais apresentaram detecção desse anticorpo. O anticorpo IgA só foi detectado no ponto 30 dpi, e também foi nesse ponto que a eficácia apresentou o menor valor nesse grupo (30,4%). O anticorpo IgE só foi detectado no ponto 15 dpi, mas não houve diferença estatística desse ponto com outros analisados.

Foi avaliada a correlação entre os níveis de anticorpos e o número de metacestódeos em G1 e G2. Houve correlação significativa no G1 no ponto 45 dpi para IgM ($p = 0,02$, $r = -0,70$) e IgG ($p = 0,02$, $r = -0,72$) (Figura 8A), mostrando uma tendência para aumento de metacestódeos com uma menor produção desses anticorpos. No G2, houve uma correlação significativa no ponto 30 dpi para anticorpos IgG ($p = 0,02$, $r = -0,75$) (Figura 8B), mas esse resultado não ocorreu nos outros pontos avaliados.

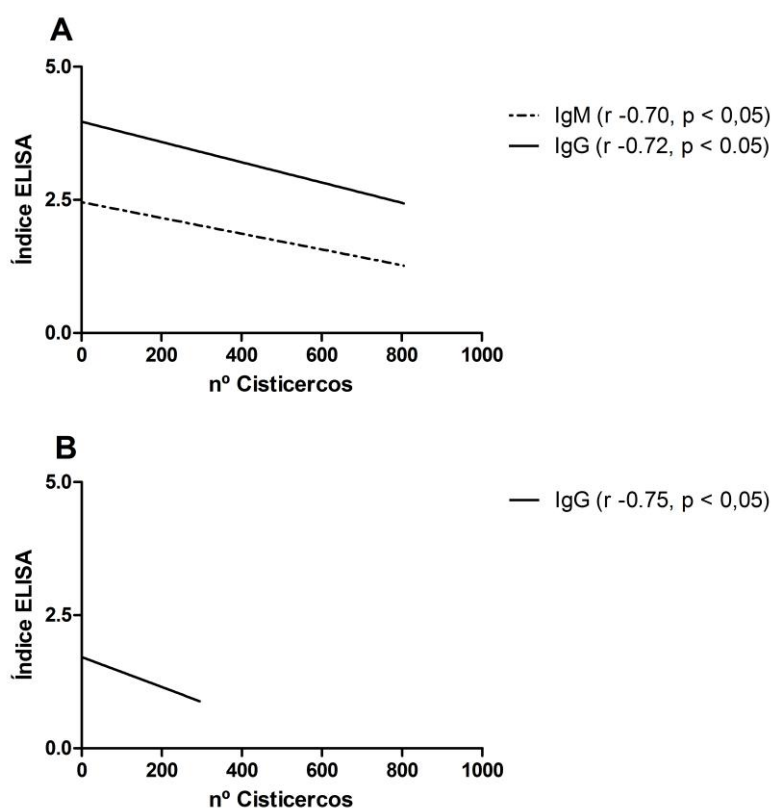


Figura 8. Correlação estatisticamente significativa em relação a quantificação de anticorpos no soro dos camundongos e o número de metacestódeos de *T. crassiceps*. A correlação entre os anticorpos das classes IgM e IgG no grupo G1, imunizado com bacteriófago mCc48 e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps*, no ponto 45 dpi. B correlação entre os anticorpos da IgG no grupo G2, imunizado com peptídeo sintético sCc48 e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps*, no ponto 30 dpi. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman. dpi = dias após infecção.

4.4. ELISA Avidéz

O ELISA avidéz foi realizado nas amostras dos grupos G1, G2 e G3 no ponto 60 dpi, e os resultados estão apresentados na Figura 9. Valores de IA acima de 68% foram considerados como IgG de alta avidéz, IA entre 64% e 68% foram classificados com avidéz intermediária e IA abaixo de 64% foi denominado de baixa avidéz, de acordo com estudo de Manhani et al. (2009).

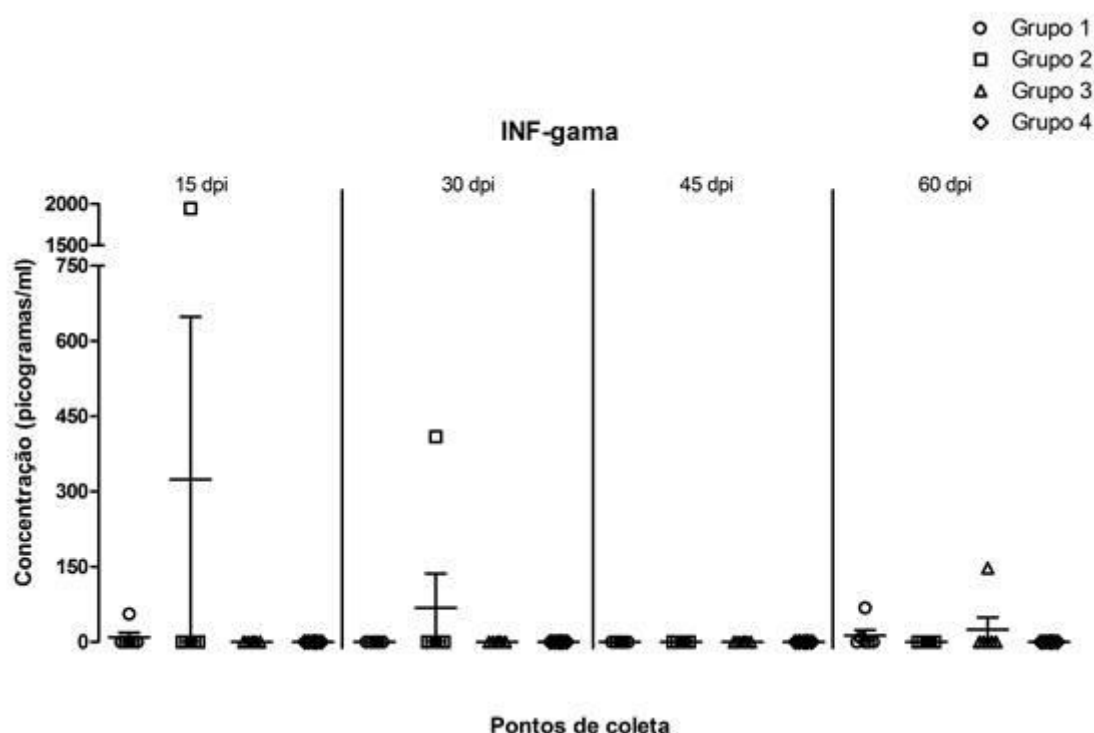


Figura 10. Detecção da citocina INF-gama por ensaio imunoenzimático (ELISA), no soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

IL-4 foi detectada em todos os grupos. A produção foi constante em G1, e apresentou tendência de diminuir com o tempo nos outros grupos. Houve diferença estatística no ponto 30 dpi entre G1 e G3, G1 e G4, e G2 e G4. (Figura 11).

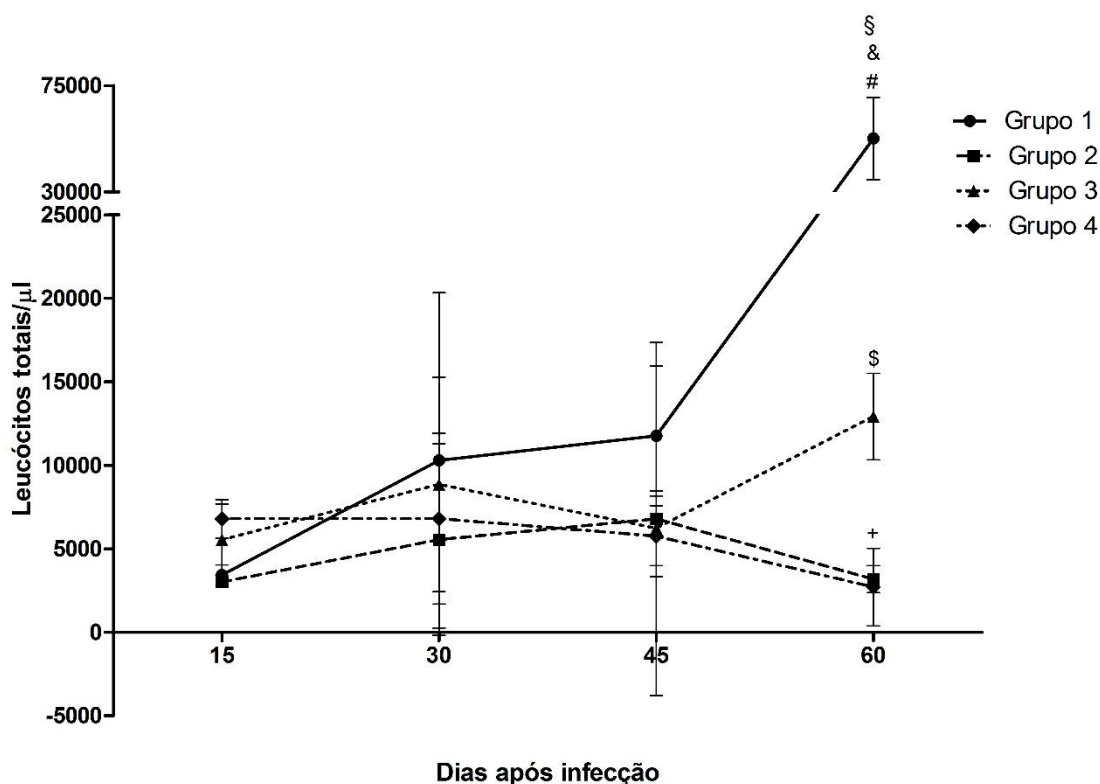


Figura 12. Contagem total de leucócitos, apresentada como média e desvio padrão, realizada em câmara de Neubauer com sangue de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico *two-way* ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. § Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4.

O G1 apresentou um aumento progressivo na contagem de leucócitos. O G2 também apresentou um discreto aumento progressivo até o ponto 45 dpi, com uma queda no ponto 60 dpi. O G3 apresentou um queda entre os pontos 30 dpi e 45 dpi, voltando a aumentar no ponto 60 dpi. O G4 apresentou um ligeiro aumento até o ponto 45 com uma queda no ponto 60 dpi. Houve diferença estatística entre os grupos somente no ponto 60 dpi, em que o G1 foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos, G2 teve uma diferença significativa do G3, e G3 de G4. Comparando os perfis dos grupos o G1 se assemelha ao G3 e o G2 está mais relacionado com o G4.

Avaliou-se a correlação entre produção de leucócitos em relação ao número de metacestódeos e verificou-se uma correlação positiva no G1 nos pontos 15 dpi (Figura 13A), 30 dpi (Figura 13B) e 60 dpi (Figura 13D), mas não houve correlação no ponto 45 dpi (Figura 13C).

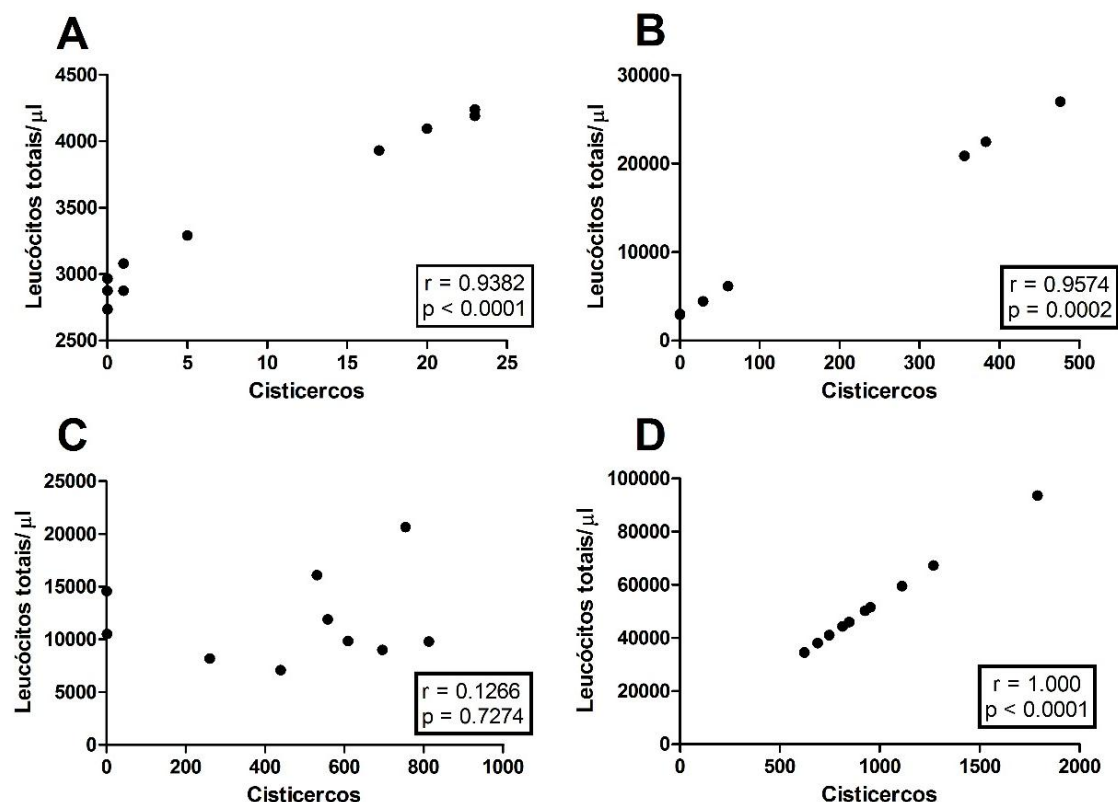


Figura 13. Correlação em relação ao número total de leucócitos e de metacestódeos de *T. crassiceps*, no grupo G1, imunizado com bacteriófago mCc48 e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps*. **A:** ponto 15 dpi. **B:** ponto 30 dpi. **C:** ponto 45 dpi. **D:** ponto 60 dpi. dpi = dias após infecção. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman.

No G2 houve correlação positiva nos pontos 15 dpi (Figura 14A), 30 dpi (Figura 14B) e 45 dpi (Figura 14C), mas não no ponto 60 dpi (Figura 14D). O G3 não apresentou correlação em nenhum ponto avaliado.

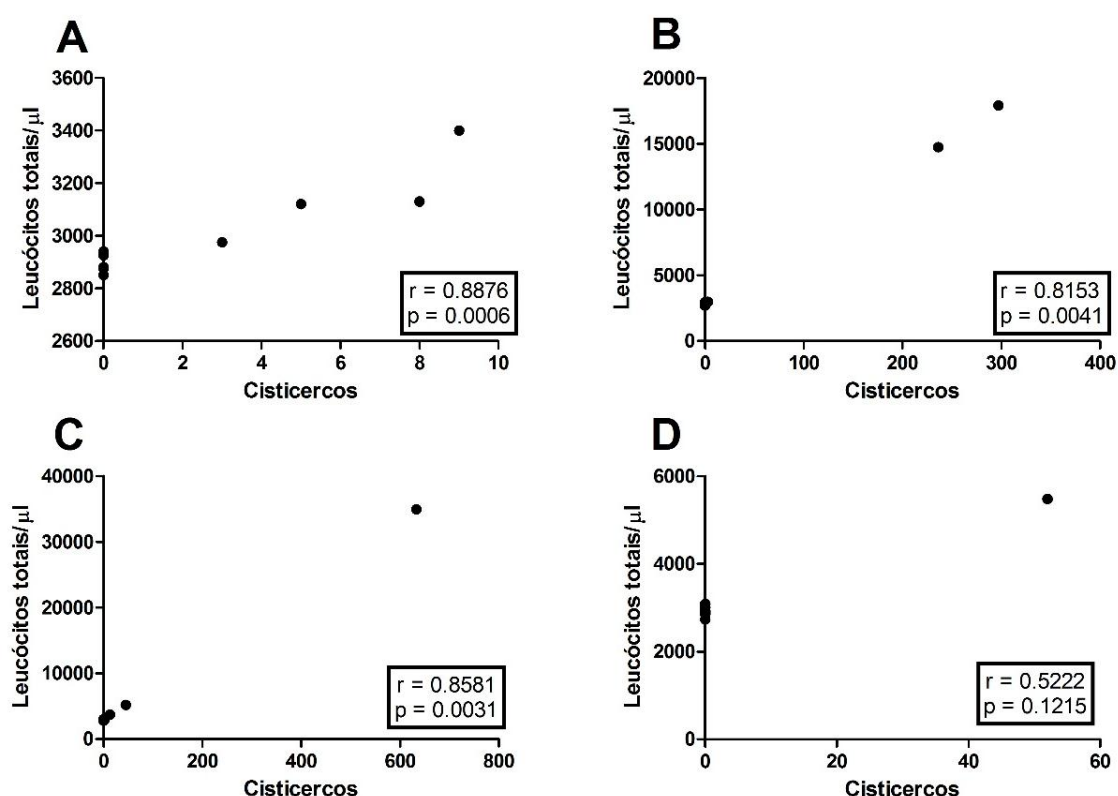


Figura 14. Correlação em relação ao número total de leucócitos e de metacestódeo de *T. crassiceps*, no grupo G2, imunizado com peptídeo sintético sCc48 e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps*. **A:** ponto 15 dpi. **B:** ponto 30 dpi. **C:** ponto 45 dpi. **D:** ponto 60 dpi. dpi = dias após infecção. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo e foi expressa em porcentagem. Através dos valores de porcentagem foi calculado o valor absoluto de cada tipo celular de acordo com o número de leucócitos totais. Assim, a análise foi realizada utilizando valores absolutos (Figuras 15 a 19) e a porcentagem (Figuras 20 a 24).

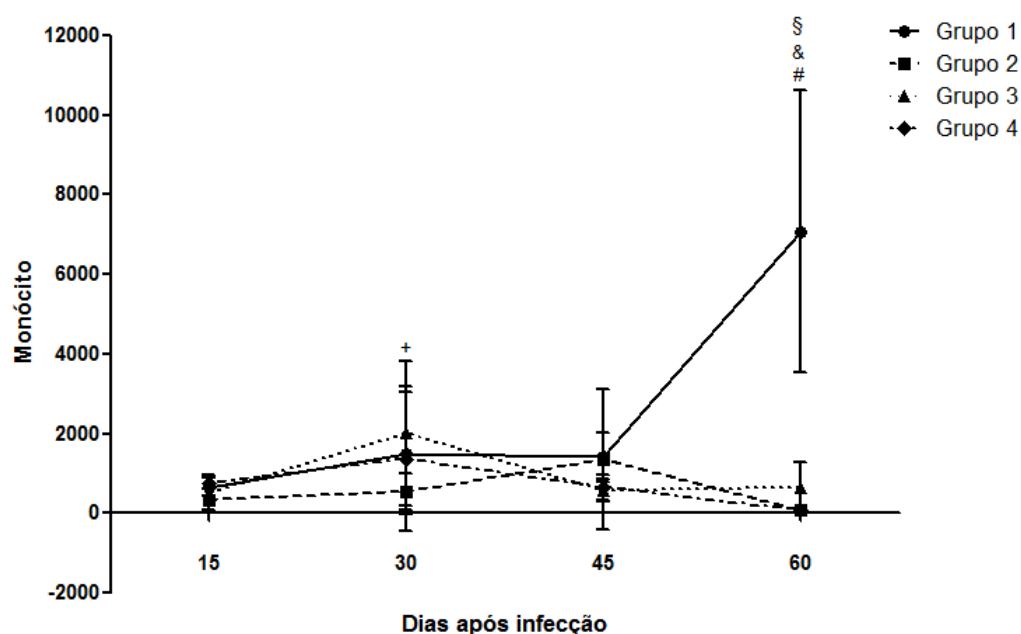


Figura 15. Valores absolutos (nº de células/µl de sangue) da contagem diferencial de monócitos, apresentada como média e desvio padrão, calculada através dos valores totais de leucócitos e porcentagem diferencial de leucócitos obtida em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico two-way ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. § Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4. ¥ Diferença estatística entre G2 e G4.

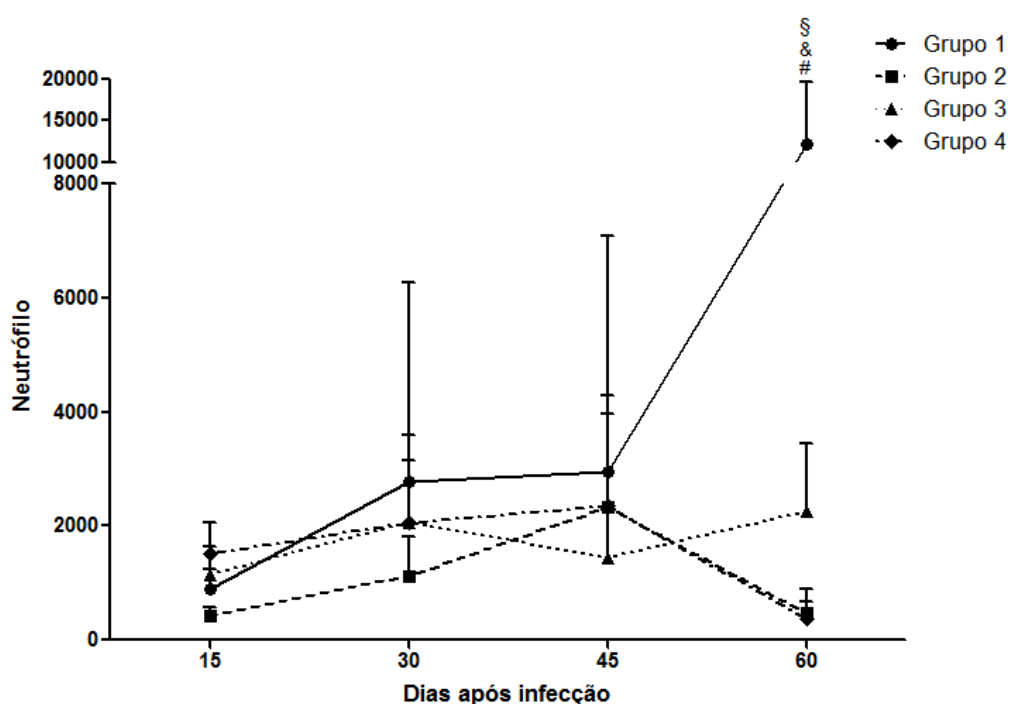


Figura 16. Valores absolutos (nº de células/µl de sangue) da contagem diferencial de neutrófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculada através dos valores totais de leucócitos e porcentagem diferencial de leucócitos obtida em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico two-way ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. § Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4. ¥ Diferença estatística entre G2 e G4.

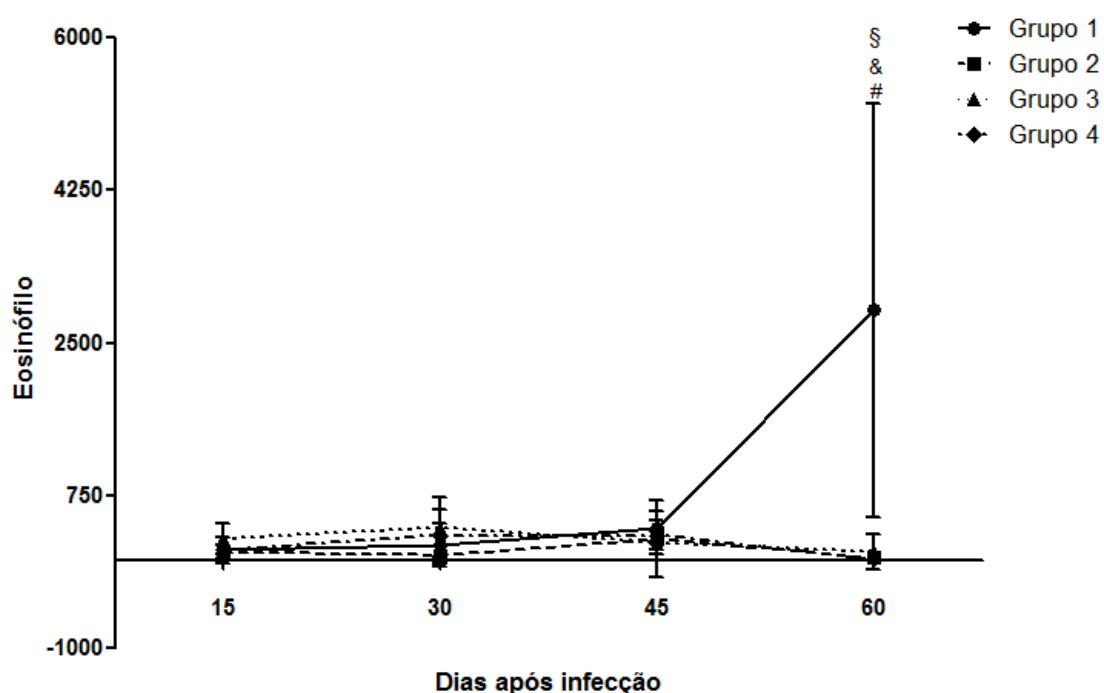


Figura 17. Valores absolutos (nº de células/ μ l de sangue) da contagem diferencial de eosinófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculada através dos valores totais de leucócitos e porcentagem diferencial de leucócitos obtida em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacésteos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico two-way ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. § Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4. ¥ Diferença estatística entre G2 e G4.

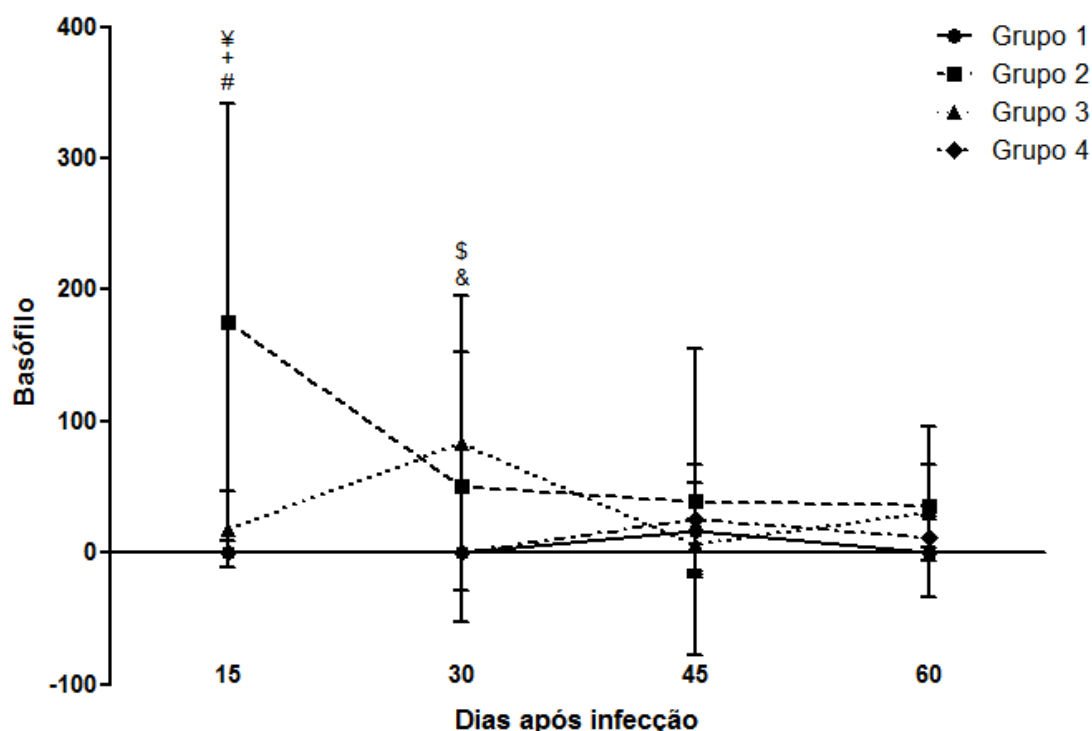


Figura 18. Valores absolutos (nº de células/ μ l de sangue) da contagem diferencial de basófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculada através dos valores totais de leucócitos e porcentagem diferencial de leucócitos obtida em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico two-way ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. § Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4. ¥ Diferença estatística entre G2 e G4.

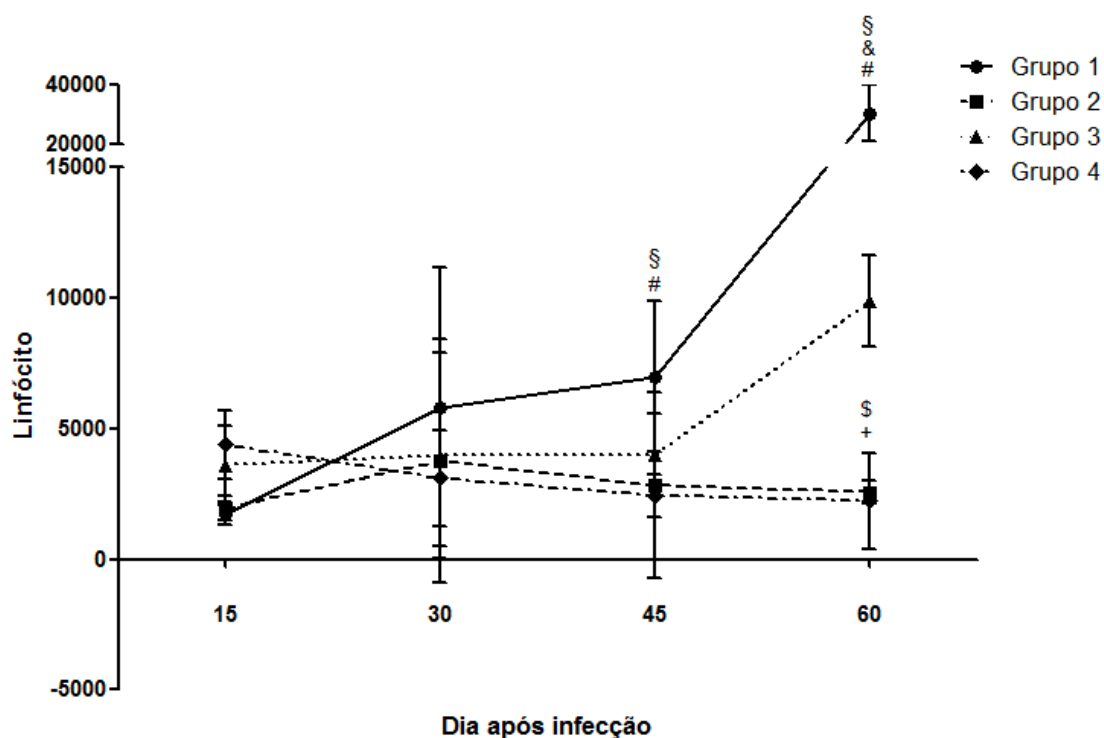


Figura 19. Valores absolutos (nº de células/µl de sangue) da contagem diferencial de linfócitos, apresentada como média e desvio padrão, calculada através dos valores totais de leucócitos e porcentagem diferencial de leucócitos obtida em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Teste estatístico two-way ANOVA. # Diferença estatística entre G1 e G2. & Diferença estatística entre G1 e G3. \$ Diferença estatística entre G1 e G4. + Diferença estatística entre G2 e G3. \$ Diferença estatística entre G3 e G4. ¥ Diferença estatística entre G2 e G4.

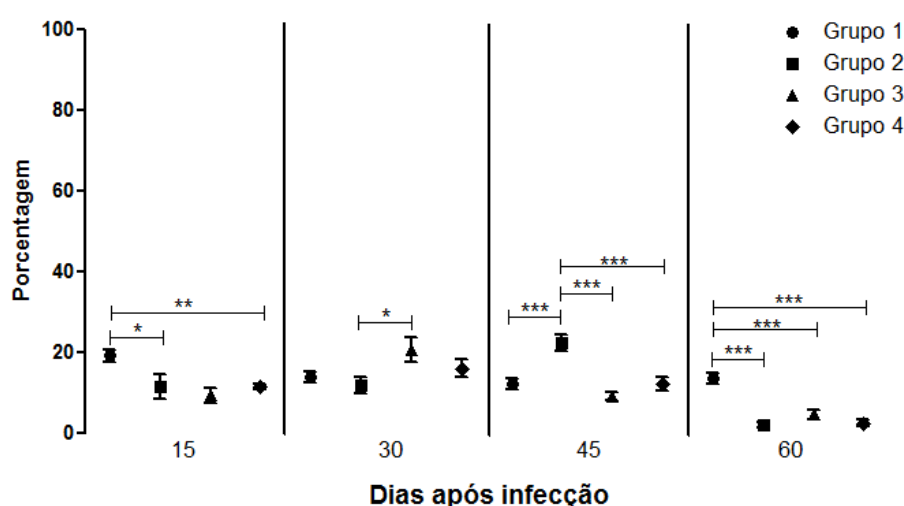


Figura 20. Porcentagem de monócitos, apresentada como média e desvio padrão, calculado por contagem em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

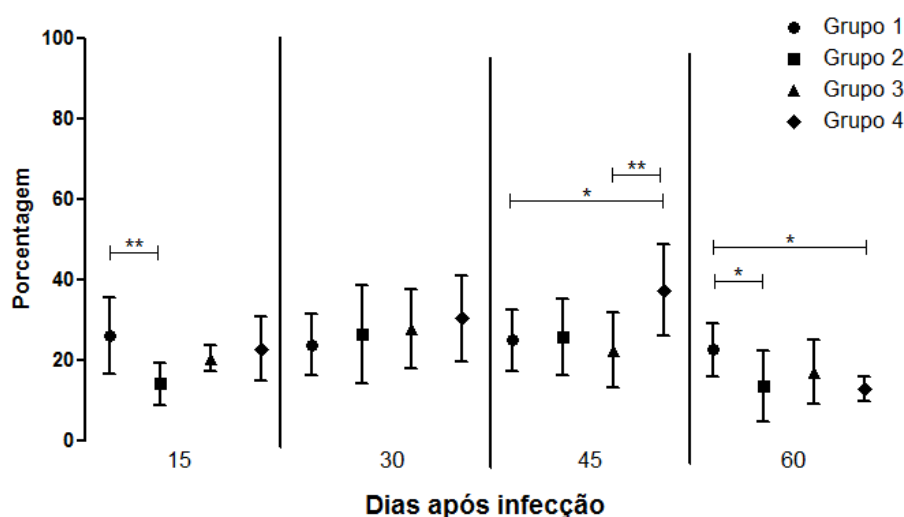


Figura 21. Porcentagem de neutrófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculado por contagem em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

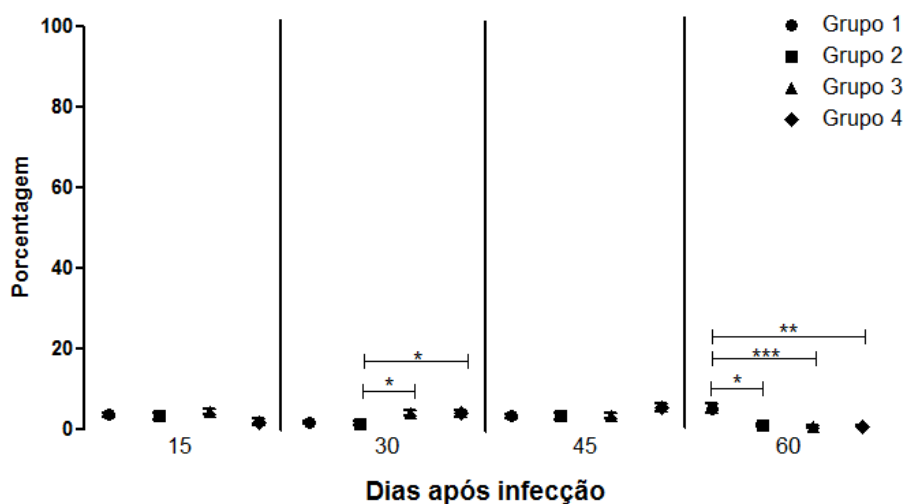


Figura 22. Porcentagem de eosinófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculado por contagem em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

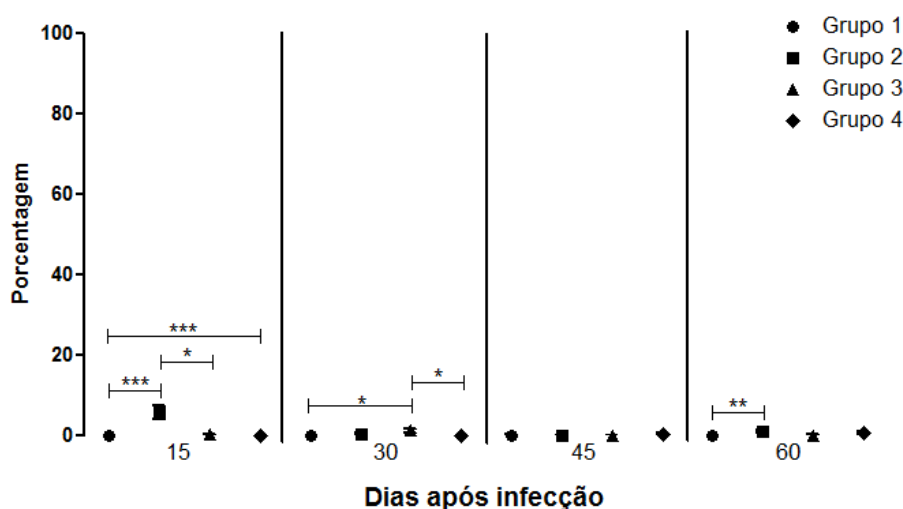


Figura 23. Porcentagem de basófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculado por contagem em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

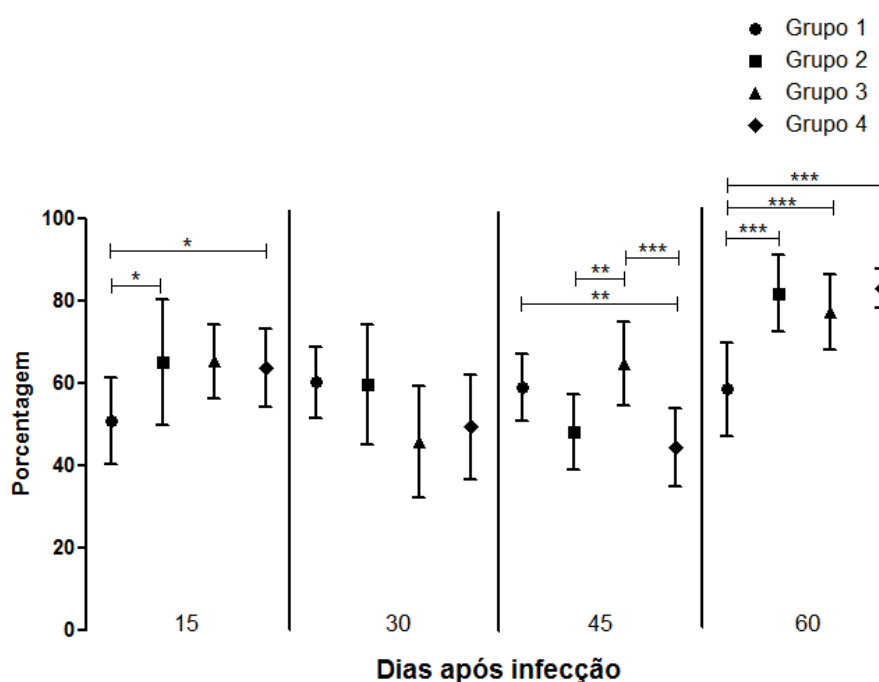


Figura 24. Porcentagem de basófilos, apresentada como média e desvio padrão, calculado por contagem em esfregaço sanguíneo de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Barra representando a média mais o desvio padrão. Teste estatístico ANOVA ou seu correspondente não paramétrico Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

O G1, em relação aos valores absolutos, apresentou um aumento progressivo de todos os tipos de leucócitos avaliados, com uma média geral de 0% de basófilo, 4% de eosinófilos, 15% de monócitos, 24% de neutrófilo e 57% de linfócitos.

Avaliando os valores absolutos no G2, verifica-se diferentes padrões para os tipos de leucócitos avaliados. Neutrófilo e monócito apresentam o mesmo comportamento, aumentando até o ponto 45 dpi seguindo de uma queda na produção no ponto 60 dpi. Eosinófilo apresenta dois picos de aumento nos pontos 15 dpi e 45 dpi. Basófilo apresenta o maior valor no ponto 15 dpi e depois apresenta um decréscimo contínuo até o ponto 60 dpi. Linfócito apresenta o maior pico de produção no ponto 30 dpi. Em relação à porcentagem, basófilo apresenta um maior valor de 6% no ponto 15 dpi, eosinófilo apresenta uma pequena variação entre os pontos com um média geral de 2%, monócito apresenta a maior porcentagem no ponto 45 dpi (26%) e a menor no ponto 60 dpi (2%), neutrófilo apresenta uma variação com valores de 14% nos pontos 15 dpi e 60 dpi e 26%

em 30 dpi e 45 dpi, linfócito apresenta os maiores valores nos pontos 15 dpi (60%) e 60 dpi (84%).

No G3 também verifica-se alterações nos padrões de produção de leucócitos. Neutrófilo, monócito e basófilo apresentam uma queda no ponto 45 dpi. A produção de eosinófilo diminui progressivamente nos pontos 45 dpi e 60 dpi. A contagem de linfócitos apresenta um aumento progressivo a partir do ponto 15 dpi. Analisando a porcentagem, nota-se diferentes padrões, basófilo apresenta pouca variação entre os pontos com uma média geral de 0%, eosinófilo mantém-se constante até o ponto 45 dpi (5%) seguido de uma queda no ponto 60 dpi (1%), monócito permanece constante até o ponto 30 dpi (21%) com progressiva queda a partir do ponto 45 dpi e apresentando o menor valor no ponto 60 dpi (5%), o mesmo acontece com neutrófilo que mantém-se constante até o ponto 30 dpi (28%) com posterior diminuição e atingindo o menor valor no ponto 60 dpi (17%), linfócito aumenta progressivamente com maior valor no ponto 60 dpi (77%).

O G4 apresenta variações nos valores totais dos leucócitos. Basófilo só é visualizado a partir do ponto 45 dpi com aumento no ponto 60 dpi. Eosinófilo e neutrófilo apresentam maiores valores nos pontos 30 dpi e 45 dpi. Monócito tem um aumento progressivo até o ponto 30 dpi, seguido por uma queda no 45 dpi que permanece constante no ponto 60 dpi. Linfócito apresenta uma queda no 45 dpi. Em relação à porcentagem, basófilo permanece constante com uma média geral de 0%, eosinófilo tem um aumento progressivo até o ponto 45 dpi (5%) seguido por uma queda (1%) e o mesmo acontece com neutrófilo com 37% em 45 dpi e 17% em 60 dpi, monócito apresenta maior porcentagem no ponto 30 dpi, e o linfócito apresenta as maiores porcentagens nos pontos 15 dpi (64%) e 60 dpi (77%).

Foi realizada a correlação entre a contagem de metacestódeos e os valores para cada tipo de leucócito analisado. O G1 foi o grupo com maiores correlações, apresentando correlações positivas nos pontos 15 dpi, 30 dpi e 60 dpi, principalmente monócito, neutrófilo e linfócito, apenas no ponto 30 dpi houve correlação com eosinófilo (Figura 25).

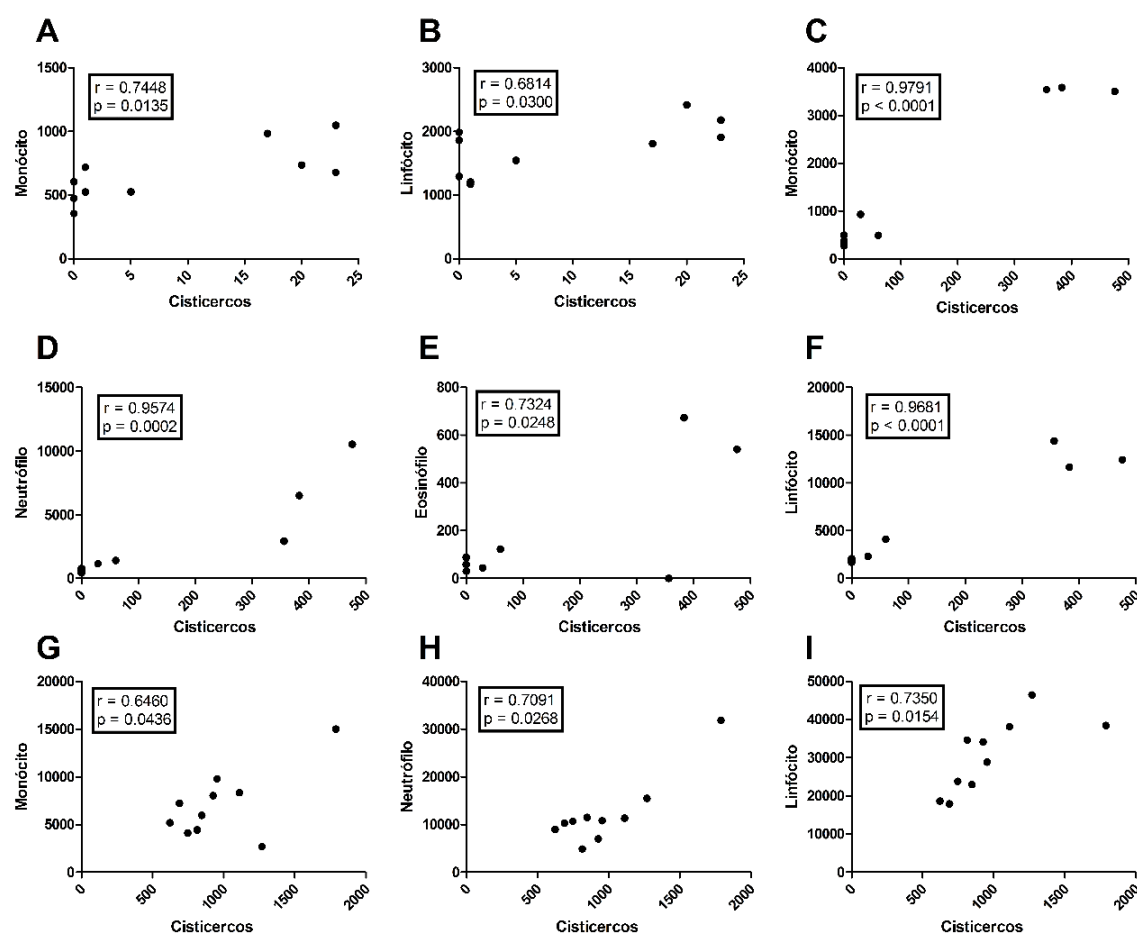


Figura 25. Correlação em relação ao número de leucócitos e de metacéstódeo de *T. crassiceps*, no grupo G1, imunizado com bacteriófago mCc48 e desafiado com metacéstódeos de *T. crassiceps*. **A:** correlação entre número de monócito e de cisticerco no ponto 15 dpi. **B:** correlação entre número de linfócito e de cisticerco no ponto 15 dpi. **C:** correlação entre número de monócito e de cisticerco no ponto 30 dpi. **D:** correlação entre número de neutrófilo e de cisticerco no ponto 30 dpi. **E:** correlação entre número de eosinófilo e de cisticerco no ponto 30 dpi. **F:** correlação entre número de linfócito e de cisticerco no ponto 30 dpi. **G:** correlação entre número de monócito e de cisticerco no ponto 45 dpi. **H:** correlação entre número de neutrófilo e de cisticerco no ponto 45 dpi. **I:** correlação entre número de linfócito e de cisticerco no ponto 45 dpi. dpi = dias após infecção. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman.

No G2 foi verificada correlação significativa entre a contagem de metacéstódeos e a produção de monócitos e basófilos no ponto 30 dpi, e com linfócito no ponto 45 dpi (Figura 26).

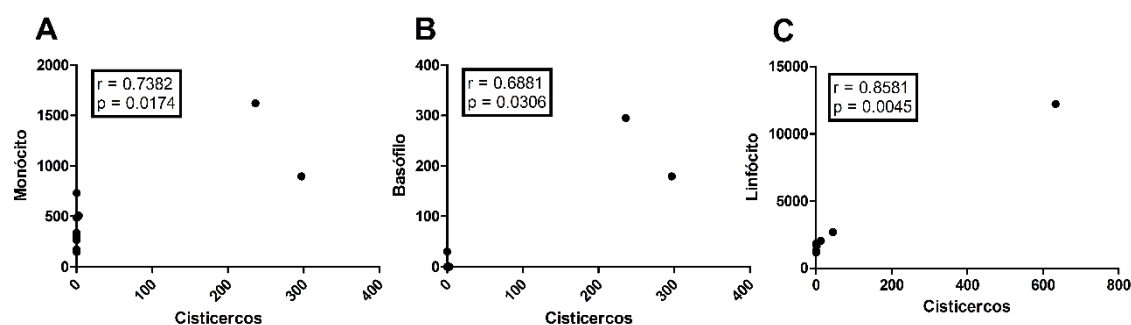


Figura 26. Correlação em relação ao número de leucócitos e de metacestódeos de *T. crassiceps*, no grupo G2, imunizado com peptídeo sintético sCc48 e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps*. **A:** correlação entre número de monócito e de cisticerco no ponto 30 dpi. **B:** correlação entre número de basófilo e de cisticerco no ponto 30 dpi. **C:** correlação entre número de linfócitos e de cisticerco no ponto 45 dpi. dpi = dias após infecção. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman.

A análise no G3 revelou correlação somente entre metacestódeos e monócitos no ponto 15 dpi (Figura 27).

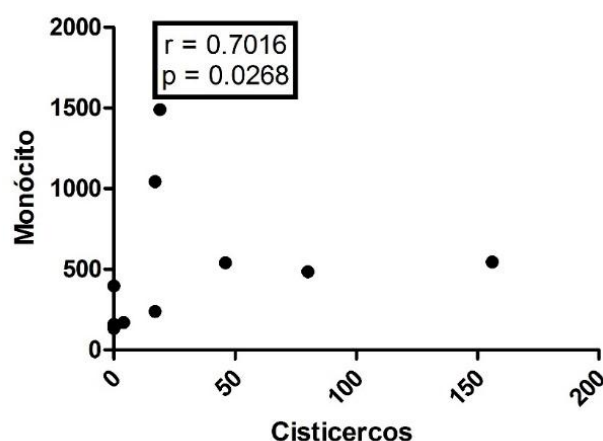


Figura 27. Correlação em relação ao número de monócitos e de metacestódeos de *T. crassiceps*, no grupo G3, imunizado com PBS e desafiado com metacestódeos de *T. crassiceps* (controle positivo), no ponto 15 dpi. dpi = dias após infecção. Teste estatístico de correlação de Pearson ou seu correspondente não paramétrico Teste de correlação de Spearman.

4.7. Reação de imunofluorescência indireta

Para confirmar a reatividade dos anticorpos contra os metacestódeos, os soros dos animais de cada grupo nos quatro pontos de análise (15, 30, 45 e 60 dpi) foram avaliados

por imunofluorescência indireta utilizando secções da forma metacestódea de *T. crassiceps* e *T. solium* como antígenos da reação.

A distribuição dos anticorpos da classe IgG dos animais dos grupos G1, G2 e G3 nos metacestódeos de *T. crassiceps* não apresentou regularidade, verificando ligação tanto na membrana quanto no interior do cisticerco (Figura 28). Para *T. solium* a ligação concentrou-se na região da membrana dos metacestódeos (Figura 29).

Os soros dos grupos G1, G2 e G3 apresentaram reatividade com os metacestódeos de ambas espécies testadas. No entanto o G1 e G2 apresentaram uma reatividade maior com os metacestódeos de *T. solium* verificada pela intensidade visualizada na reação de imunofluorescência (Figura 29) e G3 com metacestódeos de *T. crassiceps* (Figura 28). O G4 não apresentou reatividade com nenhuma das espécies.

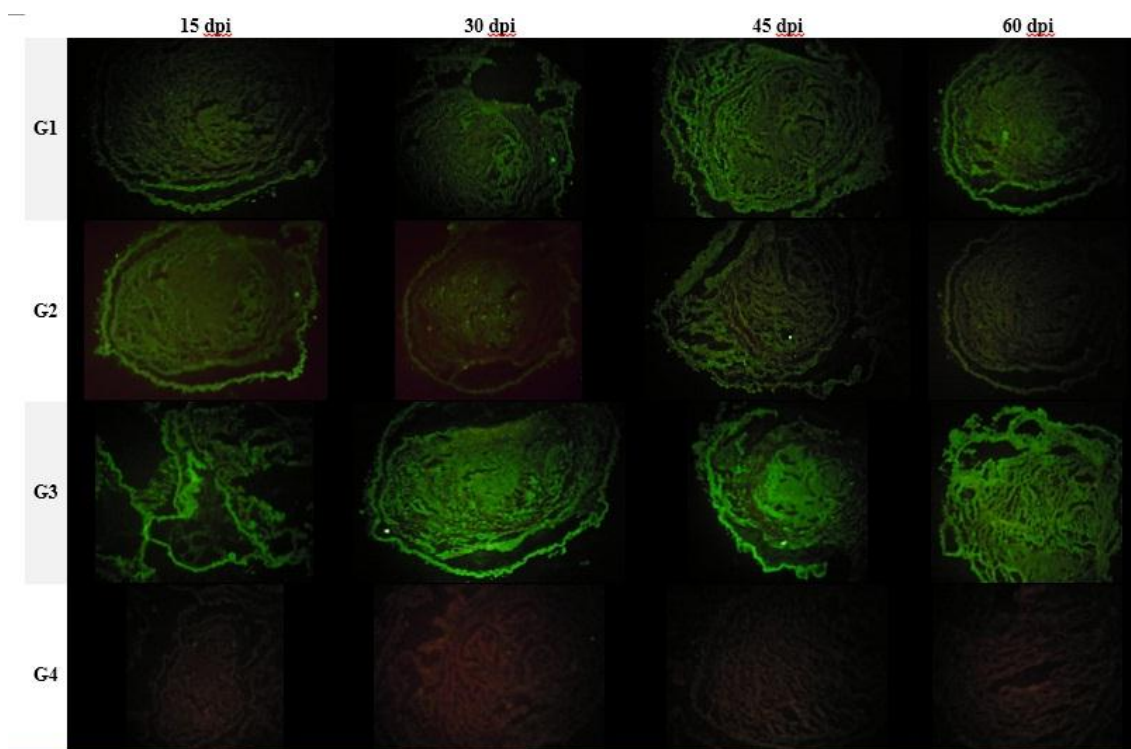


Figura 28. Imunofluorescência indireta do metacestódeos de *T. crassiceps* com soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacestódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Foi utilizado anti-IgG de camundongo marcado com FITC, e a visualização foi realizada em microscopia de fluorescência. dpi = dias após infecção.

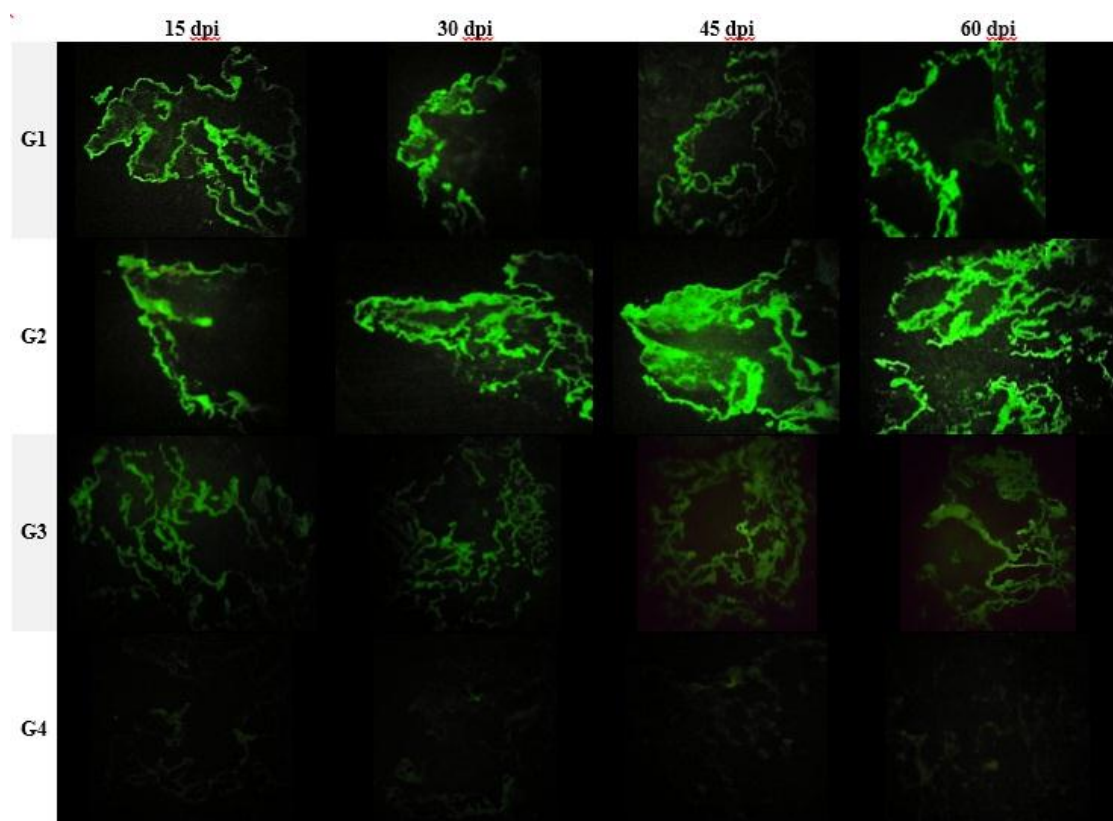


Figura 29. Imunofluorescência indireta do metacéstódeos de *T. solium* com soro de camundongos imunizados com bacteriófago mCc48 (G1), com peptídeo sintético sCc48 (G2), e PBS (G3 e G4). Soro coletado em quatro pontos após o desafio com metacéstódeos de *T. crassiceps* nos animais dos grupos G1, G2 e G3 (controle positivo), os animais do grupo G4 não foram desafiados (controle negativo). Foi utilizado anti-IgG de camundongo marcado com FITC, e a visualização foi realizada em microscopia de fluorescência.

4.8. Análise pelo BLAST

Não foram encontradas homologias completas entre o peptídeo selecionado e as proteínas do banco de dados do BLAST, nas investigações realizadas nas pelo BLASTp. Os peptídeos apresentaram similaridade com algumas proteínas de *T. crassiceps* e *T. solium*. A Tabela 4 apresenta as principais proteínas encontradas na pesquisa pelo BLAST.

Tabela 4. Alinhamento das sequências proteicas dos peptídeos selecionados com proteínas armazenadas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST.

Espécie	Proteínas do BLAST	Nº. de Acesso
<i>T. crassiceps</i>	RNA polymerase II, partial	CBH32902.1
	c-jun	AAS88552.1
	NADH dehydrogenase subunit 1	NP_066235.2
	NADH dehydrogenase subunit 3	NP_066236.2
<i>T. solium</i>	putative nucleoside triphosphate kinase	CAD21552.1
	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	Q6RWA9.1
	paramyosin	AAT94289.1
	c-jun	AAS88553.1
	NADH dehydrogenase subunit 1	ABJ96486.1
	NADH dehydrogenase subunit 1	ABK79076.1
	truncated NADH dehydrogenase subunit 1	AAL60137.1
	NADH dehydrogenase subunit 1	NP_659231.1
	putative RNA polymerase subunit	CAD21547.1

5. DISCUSSÃO

A cisticercose é uma doença altamente prevalente e sua forma neurológica, NC, provoca uma doença grave em humanos, sendo, um problema de saúde significativo, principalmente na América Latina, América Central, África sub-saariana, Índia, Sudeste Asiático, China. Cisticercose e hidatidose (equinococose) estão listadas pela Organização Mundial de Saúde entre as principais doenças tropicais negligenciadas, que correspondem a um grupo de infecções tropicais que são especificamente endêmicas em populações de baixo nível sócio-econômico em regiões subdesenvolvidas ou em desenvolvimento na África, Ásia e Américas (WHO, 2010; HOTEZ et al., 2013). A eliminação bem sucedida da cisticercose provavelmente vai exigir que a prevalência da teníase humana e da cisticercose suína atinjam o nível zero (HANDALI; PAWITAN, 2012). Estratégias para a eliminação da cisticercose incluem o desenvolvimento social, o tratamento em massa dos casos de teníase, tratamento de suínos e desenvolvimento de uma vacina eficaz, estável e de baixo custo (MANOUTCHARIAN et al., 2004; GARCIA et al., 2007).

Optou-se por iniciar o estudo com camundongos com idades entre 5 a 7 semanas, considerados adultos, pois os animais jovens possuem determinadas características de produção de citocinas que poderiam influenciar na resposta imunológica da imunização, entre essas características estão maior produção de IL-4, produção discreta de IFN-gama e ausência de IL-12. Os camundongos adultos, com o sistema imune totalmente desenvolvido, apresentam maior produção de IL-12 e IFN-gama, que polarizam para um resposta do perfil Th1 (PELIZON et al., 2007).

O mimotopo Cc48, selecionado anteriormente (MANHANI et al., 2009), foi utilizado expresso em fago (mCc48) e como peptídeo sintético (sCc48) no controle da cisticercose murina por *T. crassiceps*. Os resultados demonstraram que o peptídeo testado induziu uma resposta protetora eficaz, pois os animais que receberam sCc48 apresentaram uma redução no número de metacestódeos recuperados, e houve um aumento significativo na porcentagem de animais protegidos, nos quais não houve o desenvolvimento de metacestódeos. Adicionalmente, os resultados da versão com mCc48 demonstraram um aumento no desenvolvimento da doença, verificado pelo elevado número de metacestódeos recuperados nos animais que receberam esse antígeno. Os resultados alcançados nesse estudo podem ser comparados com os resultados de estudos semelhantes. NC-1 mimotopo de *T. solium* acoplado à albumina bovina induziu proteção de 74% no modelo murino

(CAPELLI-PEIXOTO et al., 2011). O peptídeo GK-1 de *T. crassiceps* atingiu uma taxa de proteção de 64,7%, e a taxa aumentou para 91,8 e 96%, quando os animais foram sensibilizados com GK-1 co-administrado com *Brucella* lumazina sintase (BLS) como um adjuvante e com BLS como um transportador, respectivamente (FRAGOSO et al., 2011). Baig et al. (2006) demonstraram que camundongos BALB/c imunizados com cisteína protease de *T. solium* tiveram uma redução de 72% na carga parasitária. A imunização de camundongos com paramiosina de *T. solium* (TPmy) recombinante resultou em redução de 52% na carga parasitária (VÁZQUEZ-TALAVERA et al., 2001). A vacina S3Pvac composta por três peptídeos sintéticos de *T. crassiceps*, KETc12, KETc1 e GK1, demonstrou induzir proteção contra cisticercose murina experimental, sendo que KETc1 apresentou 66,7%-100% de proteção e KETc12 induziu uma proteção de 52,7%-88,1% (TOLEDO et al., 1999; TOLEDO et al., 2001; RASSY et al., 2010). PT1, antígeno construído a partir do antígeno KETc7 de *T. crassiceps*, foi testado expresso na superfície do fago M13 (PIgphage) e como peptídeo livre (PT1) para imunizar camundongos contra cisticercose experimental, cerca de 57% dos animais imunizados com PIgphage e 50% daqueles com peptídeo PT1 não desenvolveram metacéstódeos, e com uma redução na carga de parasitária nos animais que apresentaram metacéstódeos (MANOUTCHARIAN et al., 1999). O peptídeo do presente estudo, sCc48, alcançou a taxa máxima de proteção de 90,0% e eficácia de 98,0%, 60 dias após o desafio, sendo esse resultado semelhante ou mesmo superior ao de outros peptídeos, antígenos purificados ou recombinantes, com algumas vantagens, pois é composto por apenas um peptídeo de 12 aa, que não está ligado a qualquer outra molécula e administrado com um adjuvante acessível.

Os resultados alcançados pela mCc48, expresso no M13, podem estar relacionados com o processo utilizado na inativação do fago. O método escolhido para a inativação do fago foi através de aplicação de UV. De acordo com Samoylova et al. (2012) exposição a UV resulta na completa inativação de fagos, porém estes mantêm sua capacidade de estimular produção de IgG, em oposição a inativação pelo calor, quando há pouca ou nenhuma resposta imunológica, provavelmente devido à destruição das partículas do fago. O fago utilizado no presente estudo demonstrou elevada produção de anticorpos IgG, mas não houve a indução da proteção. Uma possível explicação é que a inativação por UV mantêm a capacidade de estimular respostas imunológicas semelhantes a do fago infeccioso vivo (SAMOYLOVA et al., 2012). Gorski et al. (2012) ao estudarem a biologia dos fagos verificaram que embora seus hospedeiros naturais sejam bactérias, eles também

podem interagir com algumas populações de células de mamíferos, especialmente células do sistema imunológico, induzindo a geração de anticorpos específicos contra antígenos de fagos, mas também possuem capacidade de estimular a produção de anticorpos contra os antígeno não relacionados aos mesmos.

IgM é um anticorpo pentamérico, e o primeiro anticorpo a ser produzido após o primeiro contato com a antígeno e possui pouca capacidade de neutralização, participa da via clássica do sistema complemento. IgG é uma molécula monomérica, o anticorpo predominante no sangue, participa da opsonização de antígenos, ativação do sistema complemento e tem alta capacidade de neutralização. A produção de IgG é fundamental para que haja memória imunológica, isto é, para que, após nova exposição ao mesmo antígeno, haja resposta rápida com elevada concentração de anticorpos. IgA é um anticorpo dimérico, predominante nas secreções externas, sendo uma importante defesa contra infecções respiratórias e gástricas. IgE é um anticorpo monomérico com importante papel na proteção contra alguns parasitos, principalmente helmintos, e também está presente em casos de hipersensibilidade imediata (COICO; SUNSHINE, 2010). A presença de IgM no G1 pode estar relacionada com o desenvolvimento de uma doença aguda contra um antígeno que o organismo não havia tido contato anteriormente, isso pode evidenciar que a apresentação do peptídeo mCc48 não foi eficiente, o que não gerou a produção de anticorpos específicos. No caso de G3 a presença de IgM foi verificada até o ponto 45 dpi, podendo-se sugerir que a partir desse ponto a infecção passa para um curso crônico. A elevada produção de IgG no G1, em comparação com os outros grupos, possivelmente deve-se ao desenvolvimento da infecção. A presença de IgE, provavelmente está relacionada com o desenvolvimento dos metacestódeos, visto que foi encontrada principalmente nos grupos G1 e G3. Houve uma discreta detecção de IgA em todos os grupos, essa produção provavelmente está relacionada com o local de desenvolvimento dos metacestódeos, a cavidade abdominal que é revestida pelo peritônio, uma membrana, e IgA é produzido por esse tipo de tecido, porém a maior parte de IgA é secretada e uma parte circula no sangue. Pode-se também sugerir um envolvimento de IgA nos resultados de recuperação dos parasitos, pois nos pontos com maiores quantidades de metacestódeos houve um baixa ou nenhuma detecção de IgA.

Verificou-se que tanto em G1 quanto em G2 o aumento no número de cisticercos relacionou-se com a diminuição em IgG, em alguns pontos, e essa correlação também foi verificada para IgM no G1, no ponto 45 dpi. Apesar de não ter sido estabelecida uma

correlação significativa com IgA e IgE, a presença desses anticorpos foi maior nos pontos onde a eficácia dos compostos testados foi menor.

Nesse estudo também foi avaliado a avidéz de anticorpos IgG gerados no último ponto de análise, e verificou-se que o G1 produziu IgG majoritariamente de baixa avidéz, enquanto G2 produziu IgG de alta avidéz. A avidéz é designada como a energia de ligação entre anticorpos e um antígeno, e está associada à afinidade do anticorpos que é a constante de associação que caracteriza a ligação de um anticorpos com um epítipo. Assim, quanto maior for a afinidade do anticorpos pelo seu antígeno, maior a avidéz da interação antígeno-anticorpo (COICO; SUNSHINE, 2010). Dessa forma, anticorpos com maior avidéz tendem a precisar de maior energia para se dissociar do antígeno, o que incrementar o desenvolvimento de uma imunidade protetora.

Para melhor caracterizar o tipo de resposta imunológica gerada após a imunização, verificou-se a presença de INF-gama e IL-4 nos soros dos camundongos, através de kits de ELISA. O INF-gama foi detectado apenas em alguns animais, e para IL-4 apesar da detecção ter sido maior, não houve diferença estatísticas entre os grupos. A observação das figuras referentes a essas duas citocinas, indicam que a IL-4 foi detectada no soro mesmo na ausência do desenvolvimento de metacestódeos. Citocinas são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. O IFN-gama tem com principal atividade a imunomodulação, participando também da inibição da proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, estimula a produção de receptores de alta afinidade para IgG (FcγRI), sendo um indutor do perfil de resposta imunológica Th1 (COICO; SUNSHINE, 2010). A IL-4 é uma citocina sintetizada por células Th2, entretanto as células Th1 também podem produzi-la em quantidades menores (LE et al., 1988). A atividade principal da IL-4 é determinar o perfil da resposta imune em Th2, aumentar a expressão de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) em mastócitos e basófilos, nas células B estimula a síntese principalmente de IgE e de IgG1, sendo seu efeito antagonizado por IFN-gama. Células Th1 favorecem o desenvolvimento de resposta imune celular, estão envolvidas principalmente na defesa contra patógenos intracelulares e são caracterizadas pela secreção de IFN-gama e linfotóxina. Por outro lado, células Th2 favorecem o desenvolvimento de resposta imune humoral, ativam a defesa contra patógenos extracelulares e são caracterizadas pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 (COICO; SUNSHINE, 2010). Dessa forma esperava-se uma elevada produção de IL-4 nos animais

infectados, porém neste estudo, a heterogeneidade na produção das citocinas estudadas pode indicar que nem todos os camundongos imunizados e/ou infectados apresentam um padrão definido de baixa ou alta produção dessas citocinas. A determinação de citocinas circulantes no sangue indica que o comportamento imunológico do animais G1, que apresentaram os maiores índices de infecção, se direciona para um perfil Th2.

Os mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência e susceptibilidade a cisticercose não estão completamente esclarecidos. Os helmintos desenvolveram mecanismos complexos e versáteis para conseguirem evadir a resposta imunológica dos hospedeiros (PEÓN; ESPINOZA-JIMÉNEZ; TERRAZAS, 2013). Infecções por helmintos induzem respostas imunes polarizadas do tipo Th2 (GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003). Esse perfil caracteriza-se pela secreção de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-4 e IL-13, elevados níveis de LT CD4⁺ Th2 e T regulatório, recrutamento e ativação de LB produtores de IgG1 e IgE, eosinofilia, basofilia e mastocitose (ANTHONY et al., 2007). No entanto, a afirmação de que helmintos licitam um perfil de resposta Th2 nem sempre é precisa, principalmente quando os parasitas estão localizados em tecidos extra-intestinais (RODRIGUEZ-SOSA et al. 2002).

Camundongos Balb/c utilizados no modelo experimental para cisticercose com *T. crassiceps* produzem uma acentuada resposta imunológica de perfil Th2, e observações sugerem que a resistência à *T. crassiceps* está associada com o desenvolvimento de perfil Th1 (ALONSO-TRUJILLO et al., 2007; FREITAS et al., 2012; PEÓN; ESPINOZA-JIMÉNEZ; TERRAZAS, 2013). No entanto, a resposta imune do Balb/c durante a cisticercose experimental possui um perfil misto Th1-Th2 (TOENJES et al., 1999; SPOLSKI et al., 2000). No estágio inicial de doença murina por *T. crassiceps*, há uma resposta Th1 transitória, com níveis aumentados de IL-2, INF-gama, presença de resposta antígeno específica, hipersensibilidade tardia e IgG2a associado com baixa taxa de reprodução do parasito. Com a progressão da doença, segue uma resposta Th2 mais permanente, caracterizada por altos níveis de IL-4, IL-6, IL-10, IgG2b e IgG1, relacionada com aumento nas taxas de reprodução dos metacéstódeos (TERRAZAS et al., 1998). No entanto não foi verificado correlação entre uma resposta proliferativa e a produção de INF-gama, o mesmo ocorreu no estudo de MANOUTCHARIAN et al. (1999), e é interessante notar que nesse estudo a imunização também foi realizada com adjuvante de Freund. A imunização de antígenos proteicos com adjuvante completo de Freund (ACF) resulta em respostas celulares Th1 e Th17 dependendo do componente micobacteriano

(SHENDEROV et al., 2010). Em contraste, os efeitos desse adjuvante na resposta humoral independe de respostas inflamatórias (GAVIN et al., 2006). Embora o componente micobacteriano de ACF desempenhe um papel importante na estimulação da imunidade mediada por células, a emulsificação de antígenos em óleo de parafina ou de surfactante, ou seja, o adjuvante incompleto de Freund, pode aumentar substancialmente as respostas de anticorpos (MOREIRA et al., 2008). No entanto, porque estas emulsões são susceptíveis de causar danos celulares após a injeção, especula-se que os sinais endógenos libertados durante a morte celular por necrose pode também contribuir para a sua atividade adjuvante (COFFMAN et al., 2010). Nesse estudo há poucas evidências do desenvolvimento do perfil inflamatório, associação à resistência da cisticercose murina, principalmente no grupo G2, que apresentou os melhores índices de proteção. No entanto, a ausência de detecção de IgE nesse grupo leva-se a sugerir um desvio da resposta para o perfil Th1, apesar de uma sugestiva resposta mista entre Th1 e Th2 nos grupos G1, G2 e G3.

Realizou-se também a contagem total e diferencial de leucócitos. Comparando-se com os valores de referência (ARAÚJO, 2012), o G1 apresentou de forma geral, um aumento no número de leucócitos a partir do ponto 30 dpi, associado a monocitose e linfocitopenia em relação ao percentual em todos os pontos, sendo que no último ponto, 60 dpi, apresentou aumento geral de leucócitos, sendo que somente basófilo não estava aumentado. O G2 teve como resultado global uma monocitose, linfopenia em relação ao percentual nos pontos 15, 45 e 60 dpi, no ponto 60 dpi apresentou neutropenia, e no ponto 15 dpi apresentou neutropenia e basofilia. G3 apresentou um quadro geral de monocitose, com linfopenia nos pontos 15 e 30 dpi, com leucocitose no ponto 60 dpi. G4 também apresentou um quadro geral de monocitose, com linfocitopenia nos pontos 15, 30 e 45 dpi, no ponto 45 dpi apresentou ainda uma neutrofilia, e no ponto 60 dpi houve neutropenia. G1 apresentou um perfil na produção de leucócitos mais semelhante ao de G3, e G2 ao de G4. Ressalta-se que nos pontos de maior proteção em G2, 15 e 60 dpi, houve uma diminuição no percentual de neutrófilos (neutropenia), e detecção de basófilos.

Leucocitose é o aumento no número de leucócitos no sangue, esse aumento pode ou não estar relacionado com o aumento de alguma classe de leucócito específica, e geralmente ocorre devido a um processo inflamatório. Sendo que os casos de leucocitose observados no estudo ocorreram nos G1 e G3. Neutrofilia, aumento do número de neutrófilos, pode estar relacionado com processos inflamatórios agudos e a presença de histamina. Monocitose, aumento de monócitos, está tradicionalmente associada com

doença crônica, particularmente a doenças inflamatórias crônicas, participando em todos os tipos de inflamação granulomatosa. Eosinofilia, aumento de eosinófilos, é induzida pela presença de helmintos multicelulares parasitos. Linfocitose está mais relacionada com a presença de microorganismos intracelulares, mas é um achado clínico incomum e não há interpretação específica. Causas de basofilia podem ser dermatites alérgicas, eczemas e reações de hipersensibilidade (KERR, 2003; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

Na outra ponta temos os casos de diminuição de leucócitos, sendo que encontramos neutropenia e linfocitopenia. A neutropenia pode estar associada à infecção bacteriana maciça e crônica, infecção viral e por protozoários, mas também pode estar relacionada com algumas drogas e medicamentos. A linfopenia frequentemente acompanha o estresse de muitas doenças agudas (KERR, 2003; LATIMER; MEYER, 1992).

Para confirmar a reatividade dos anticorpos IgG contra os metacestódeos, os soros dos animais de cada grupo nos quatro pontos de análise (15, 30, 45 e 60 dpi) foram avaliados por imunofluorescência indireta utilizando secções da forma metacestódea de *T. crassiceps* e *T. solium*. Houve reatividade cruzada do soro dos animais dos grupos G1, G2 e G3 contra as espécies testadas, porém G1 e G2 tiveram uma reatividade maior com os metacestódeos de *T. solium*, visto que o peptídeo utilizado nas imunizações foi selecionado, por *phage display*, a partir de material obtido de metacestódeos de *T. solium* (MANHANI et al., 2011), e G3 foi mais reativo com metacestódeos de *T. crassiceps*, possivelmente por terem sido imunizados com PBS e apresentado infecção ativa com esse parasito. A distribuição dos anticorpos nos metacestódeos de *T. crassiceps* não apresentou regularidade, verificando ligação tanto na membrana quanto no interior do cisticerco, porém para *T. solium* a ligação concentrou-se na região da membrana dos metacestódeos, indicando que o peptídeo selecionado concentra-se nessa região no caso de *T. solium*. A verificação de reação cruzada entre anticorpos gerados contra metacestódeos de *T. crassiceps* com metacestódeos de *T. solium* foi comprovada anteriormente (ESPÍNDOLA et al., 2000; TOLEDO et al., 2001). A reatividade cruzada entre antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps* (ESPÍNDOLA et al., 2000; TOLEDO et al., 2001), assim como também com antígenos de *T. saginata* (NUNES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2007), confirmam que os parasitos possuem epítomos em comum e que estão em quantidade suficiente para serem utilizados tanto no diagnóstico quanto no desenvolvimento de compostos vacinais, pois a obtenção de antígenos heterólogos é facilitada no caso de estudos em cisticercose.

O tegumento dos platelmintos, incluindo os cestodas, é constituído de uma membrana externa formada por um sincício anucleado e uma membrana interna composta por tecido muscular (CAPELLI-PEIXOTO et al., 2011). A superfície externa de *T. crassiceps* é rica em mitocôndrias e enzimas mitocondriais relacionadas com o metabolismo energético, incluindo a citocromo c oxidase (ZENKA; PROKOPIC, 1986) e NADH desidrogenase (ZENKA; PROKOPIC, 1987). A mitocôndria contém seu próprio DNA mitocondrial (mtDNA), com genes para RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportador (tRNA), e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa como adenosina trifosfato subunidades 6 e 8, citocromo b, citocromo c oxidase subunidade 1-3 (Cox1-3) e NADH desidrogenase subunidades 1-6 e 4L (ND1-6 e 4L). Entre as proteínas codificadas pelo mtDNA de *T. solium* estão a NADH desidrogenase subunidades 2 e a citocromo c oxidase subunidade I (NAKAO; SAKO; ITO, 2003). O gene c-jun, juntamente com c-fos, está relacionado com a proliferação e diferenciação celular nesses parasitos (MORALES-MONTOR et al., 2004). A paramiosina, também conhecida como antígeno B, é expressa especificamente no estágio de metacestódeo em *T. solium* (GUO et al., 2007), sendo uma proteína encontrada no tegumento e músculos com importante papel na sobrevivência do parasito, inibindo a fração C1q do sistema complemento, e sua forma recombinante, a TPmy, induz proteção na cisticercose murina de até 79% (VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2003; SOLÍS, VÁSQUEZ-TALAVERA, LACLETTE, 2004). ATPases transportadora de Sódio/Potássio carregam ativamente o transporte de 3Na⁺ (fora) e 2K⁺ (dentro) através da membrana, gerando gradientes químicos e elétricos, requeridos para manter o potencial de descanso celular, capacidade de excitação dos miócitos e neurônios e, em alguns casos, para importação de nutrientes como glucose e aminoácidos para dentro das células. Em *T. solium*, atividade de ATPase foi encontrada na superfície do cisticerco, podendo estar relacionada à proteção do parasito contra respostas mediadas pelo complemento (WILLMS et al., 2004). Analisando as proteínas às quais os peptídeos foram similares, a inativação dessas proteínas tem potencial de alguma forma interferir na viabilidade do cisticerco, reafirmando a utilização do peptídeo em ensaios de vacinação.

Esse conjunto de resultados suporta a possível eficácia do peptídeo sintético sCc48 como um componente para uma vacina contra cisticercose. E a reatividade comprovada contra metacestódeos de *T. solium* faz com que esse peptídeo possa ser um potencial composto para vacinação da cisticercose, e posteriormente de humanos.

6. CONCLUSÕES

- Em relação a geração de proteção dos animais imunizados, houve maior eficácia para o peptídeo sintético sCc48.
- Houve uma relativa associação do perfil Th1 com resistência ao desenvolvimento da cisticercose murina, e de Th2 com susceptibilidade aumentada à doença.
- Houve reatividade cruzada dos anticorpos produzidos nos grupos imunizados e infectados quando testados com as espécies *T. crassiceps* e *T. solium*.
- São necessários mais estudos para validação do peptídeo sintético sCc48 como composto vacinal para proteção da cisticercose, utilizando um número maior de animais e outras espécies de tenídeos e hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBA, K.; RAMARATNAM, S.; RANGANATHAN, L. N. Anthelmintics for people with neurocysticercosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 17, p. CD000215, 2010.

ABRAHAM, R.; LIVRAMENTO, J. A.; LEITE, C. D. A. C.; PARDINI, A. X.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. dos R. Neurocysticercosis: relationship between *Taenia* antigen levels in CSF and MRI. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, p. 7-11, 2010.

ADDA, C. G.; ANDERS, R. F.; TILLEY, L.; FOLEY, M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 5, p. 1-14, 2002.

AGAPEJEV, S. Aspectos clínicos-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p.822-828, 2003.

ALARCÓN, F. Neurocysticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. **Revista de Neurología**, v. 43, p. S93-S100, 2006.

ALMEIDA, C.R.; OJOPI, E. P.; NUNES, C. M.; MACHADO, L. R.; TAKAYANAGUI, O. M.; LIVRAMENTO, J. A.; ABRAHAM, R.; GATTAZ, W. F.; VAZ, A. J.; DIAS-NETO, E. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, p. 307–310, 2006.

ALONSO-TRUJILLO, J.; RIVERA-MONTOYA, I.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; TERRAZAS, L. I. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1341-1350, 2007.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, pp. 975–987, 2007.

ARAÚJO, F. T. M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ.** Dissertação de Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Belo Horizonte, 2012

*Segundo normas da ABNT, NBR 6023:2002

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.

AZZAZY, W.; HIGHSMITH Jr, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002.

BAIG, S.; DAMIAN, R. T.; MORALES-MONTOR, J.; GHALEB, A.; BAGHDADI, A.; WHITE, A. C. JR. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2733-2735, 2006.

BETANCOURT, M. A.; ALUJA, A. S.; SCIUTTO, E.; HERNÁNDEZ, M.; BOBES, R. J.; ROSAS, G.; HERNÁNDEZ, B.; FRAGOSO, G.; HALLAL-CALLEROS, C.; AGUILAR, L.; FLORES-PERÉZ, I. Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvac anticysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia pisiformis* cysticercosis. **Vaccine**, v. 30, n. 17, p. 2760-2767, 2012.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 749-767, 2010.

BRUNETTI, E.; WHITE JR, A. C. Cestode infestations: hydatid disease and cysticercosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 421-435, 2012.

BUENO, E. C. Cysticercosis and the immunosuppression: what are the mechanisms involved?. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 4, p. 243-244, 2012.

BUENO, E. C.; DOS RAMOS MACHADO, L.; LIVRAMENTO, J. A.; VAZ, A. J. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). **Acta Tropica**, v. 91, n. 2, p. 205-213, 2004.

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.

CAPELLI-PEIXOTO, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; CHAVES-MOREIRA, D.; MINOZZO, J. C.; GABARDO, J.; TEIXEIRA, K. N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L. M.; DE MOURA, J. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v. 28, 9473-9479, 2011.

CARABIN, H.; NDIMUBANZI, P. C.; BUDKE, C. M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y.; COWAN, L. D.; STONER, J. A.; RAINWATER, E.; DICKEY, M. Clinical

manifestations associated with neurocysticercosis: a systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1152, 2011.

CAROD-ARTAL, F. J. Tropical causes of epilepsy. **Revista de Neurologia**, v. 49, p. 475-482, 2009.

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

CIOMS. **International guiding principles for biomedical research involving animals**, Genebra, 1985. Disponível em: <http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm>. Acesso em: 17 nov. 2010.

CHAVARRÍA, A.; FLEURY, A.; BOBES, R. J.; MORALES, J.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 4, p. 1082-1089, 2006.

CHAVARRÍA, A.; ROGER, B.; FRAGOSO, G.; TAPIA, G.; FLEURY, A.; DUMAS, M.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1109–1115, 2003.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v. 33, p. 492-503, 2010.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 369 p.

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

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

COSTA-CRUZ, J. M.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; DE MORAES, A. T.; GUIMARÃES, A. H.; SALOMÃO, E. C.; ALCÂNTARA, T. M. Occurrence of cysticercosis in autopsies performed in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 53, p. 227-232, 1995.

CUI, J.; REN, H. J.; LIU, R. D.; WANG, L.; ZHANG, Z. F.; WANG, Z. Q. Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 31, p. 1171-1177, 2013.

DA SILVA RIBEIRO, V.; MANHANI, M. N.; CARDOSO, R.; VIEIRA, C. U.; 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.

DANIELS, T. L.; MOORE, T. A. Neurocysticercosis in Kansas. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 150 - 152, 2006.

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

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

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

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: actualización em diagnóstico y tratamiento. **Neurologia**, v. 20, p. 412-418, 2005.

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.

DEL LA GARZA, Y.; GRAVISS, E. A.; DAVER, N. G.; GAMBARIN, K. J.; SHANDERA, W. X.; SCHANTZ, P. M.; WHITE JR, A. C. Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 766-770, 2005.

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

DUA, T.; ANEJA, S. Neurocysticercosis: management issues. **Indian Pediatrics**, v. 43, p. 227-235, 2006.

ENSEÑAT, J.; MARTÍNEZ-MAÑAS, R.; HORCAJADA, J. P.; DE JUAN, C.; FERRER, E. Dificultades diagnósticas y terapéuticas en la neurocisticercosis: presentación de 6 casos y revisión de la literatura. **Neurocirugía**, v. 18, p. 101-110, 2007.

ESPÍNDOLA, N. M.; DE GASPARI, E. N.; NAKAMURA, P. M.; VAZ, A. J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. **Veterinary Parasitology**, v. 89, p. 321-326, 2000.

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.

FAÇANHA, M. C. Casos de cisticercose em pacientes internados pelo Sistema Único de Saúde: distribuição no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 484-487, 2006.

FENG, B.; DAI, Y.; WANG, L.; TAO, N.; HUANG, S.; ZENG, H. A novel affinity ligand for polystyrene surface from a phage display random library and its application in anti-HIV-1 ELISA system. **Biologicals**, v. 37, p. 48-54, 2009.

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

FLEURY, A.; GARCIA, E.; HERNÁNDEZ, M.; CARRILLO, R.; GOVEZENSKY, T.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M. Neurocysticercosis: HP10 antigen detection is useful for the follow-up of the severe patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, e2096, 2013.

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

FLISSER, A.; GAUCI, C. G.; ZOLI, A.; MARTINEZ-OCAÑA, J.; GARZA-RODRIGUEZ, A.; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J. L.; MARAVILLA, P.; RODRIGUEZ-CANUL, R.; AVILA, G.; AGUILAR-VEGA, L.; KYNGDON, C.; GEERTS, S.; LIGHTOWLERS, M. W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5292-5297, 2004.

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

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

FRAGOSO, G.; ESQUIVEL-GUADARRAMA, F.; SANTANA, M. A.; BOBES, R. J.; HERNÁNDEZ, B.; CERVANTES, J.; SEGURA, R.; GOLDBAUM, F. A.; SCIUTTO, E.; ROSAS, G. Heterologous prime-boost oral immunization with gk-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1067-1076, 2011.

FREITAS, A. A.; MOURA, V. B. L.; GONÇALVES, S. F.; RODRIGUES, A. A.; FÉLIX, R. M.; SOARES, T. P.; IRUSTA, V. R. C.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; LINO-JUNIOR, R. S. Kinetics of the inflammatory response in subcutaneous cysticercosis induced in mice by *Taenia crassiceps*. **Journal of Comparative Pathology**, In Press, Available online 3 February 2012.

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

GARCIA, H. H.; EVANS, C. A. W.; NASH, T. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; WHITE JR., A. C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V. C. W.; SCHANTZ, P. M.; ALLAN, J. C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J. S.; MARTINEZ, S. M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; DEL BRUTTO, O. H. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 747-756, 2002.

GARCIA, H. H.; GONZÁLEZ, A. E.; DEL BRUTTO, O. H.; TSANG, V. C.; LLANOS-ZAVALAGA, F.; GONZÁLEZ, G.; ROMERO, J.; GILMAN, R. H.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, p. 153-157, 2007.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 411–419, 2003.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H. Cysticercosis of the central nervous system: how should it be managed? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, p. 423-427, 2011.

GAUSE, W. C.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v. 24, p. 269-277, 2003.

GAVIN, A. L.; HOEBE, K.; DUONG, B.; OTA, T.; MARTIN, C.; BEUTLER, B.; NEMAZEE, D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. **Science**, v. 314, p. 1936–1938, 2006.

GAZARIAN, K. G.; ROWLEY, M. J.; GAZARIAN, T.G.; SOTELO, J.; GARCÍA-MENDOZA, E.; HERNÁNDEZ, R. Post-panning computer-aided analysis of phagotope collections selected with neurocysticercosis patient polyclonal antibodies: separation of disease-relevant and irrelevant peptide sequences. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 4, p. 221-235, 2001.

GIMÉNEZ-ROLDÁN, S.; DÍAZ, F.; ESQUIVEL, A. Neurocysticercosis e inmigración. **Neurología**, v. 18, p. 385–388, 2003.

GOMES, I.; VEIGA, M.; CORREA, D.; MEZA-LUCAS, A.; MATA, O.; GARCIA, R. C.; OSORNIO, A.; RABELO, R.; LUCENA, R.; MELO, A. Cysticercosis in epileptic patients of Mulungu do Morro Northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, p. 621-624, 2002.

GONZALEZ, A. E.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. W. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, v. 87, p. 103-109, 2003.

GUO, A.; CAI, X.; JIA, W.; LIU, B.; ZHANG, S.; WANG, P.; YAN, H.; LUO, X. Mapping of *Taenia solium* TSOL18 antigenic epitopes by phage display library. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1151-1157, 2010.

GUO, A.; JIN, Z.; ZHENG, Y.; HAI, G.; YUAN, G.; LI, H.; CAI, X. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 170-175, 2007.

HANDALI, S.; PAWITAN, Y. Verifying elimination programs with a special emphasis on cysticercosis endpoints and postelimination surveillance. **Journal of Parasitology Research**, 974950, 2012.

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

HOTEZ, P. J.; DUMONTEIL, E.; HEFFERNAN, M. J.; BOTTAZZI, M. E. Innovation for the 'bottom 100 million': eliminating neglected tropical diseases in the Americas. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 764, p. 1-12, 2013.

HUERTA, M.; DE ALUJA, A. S.; FRAGOSO, G.; TOLEDO, A.; VILLALOBOS, N.; HERNÁNDEZ, M.; GEVORKIAN, G.; ACERO, G.; DÍAZ, A.; ALVAREZ, I.; AVILA, R.; BELTRÁN, C.; GARCIA, G.; MARTINEZ, J. J.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. **Vaccine**, v. 20, p. 262-266, 2001.

HUSAIN, M.; JHA, D. K.; RASTOGI, M.; HUSAIN, N.; GUPTA, R. K. Neuro-endoscopic management of intraventricular neurocysticercosis (NCC). **Acta Neurochirurgica**, v. 149, p. 341-346, 2007.

JAYASHI, C. M.; KYNGDON, C. T.; GAUCI, C. G.; GONZALEZ, A. E.; LIGHTOWLERS, M. W. Successful immunization of naturally reared pigs against porcine cysticercosis with a recombinant oncosphere antigen vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 261-267, 2012.

KRAFT, R. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. **American Family Physician**, v. 76, p. 91-96, 2007.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 61-80.

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.

LATIMER, K. S.; MEYER, D. J. Os leucócitos na Saúde e na Moléstia. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. v. 4, p. 2616-2664.

LE, H. V.; RAMANATHAN, L.; LABDON, J. E.; MAYS-ICHINCO, C. A.; SYTO, R.; ARAI, N.; HOY, P.; TAKEBE, Y.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P. Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, p. 10817-10823, 1988.

LESCANO, A. G.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; GAVIDIA, C. M.; TSANG, V. C.; RODRIGUEZ, S.; MOULTON, L. H.; VILLARAN, M. V.; MONTANO, S. M.; GONZALEZ, A. E.; THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. *Taenia solium* Cysticercosis hotspots surrounding tapeworm carriers: clustering on human seroprevalence but not on seizures. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3, p. e371, 2009.

LIGHTOWLERS, M. W. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. **Parasitology**, v. 133, p. S27-S42, 2006.

LINO-JUNIOR, R. S.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. Occurrence of encephalic and cardiac cysticercosis (*Cysticercus cellulosae*) in necropsy. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 495-498, 1999.

LINO-JUNIOR, R. S.; FALEIROS, A. C.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. Anatomopathological aspects of neurocysticercosis in autopsied patients. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 65, p. 87-91, 2007.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.

MACHADO, L. R. The diagnosis of neurocysticercosis: a closed question? **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, p. 1-2, 2010.

MANDAL, J.; SINGHI, P. D.; KHANDELWAL, N.; MALLA, N. Evaluation of lower molecular mass (20–24 kDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1097-1101, 2008.

MANHANI, M. N. **Seleção de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas Y anti-metacestódeo de *Taenia solium* por phage display**. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, Uberlândia, 2009.

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.

MANHANI, M. N.; DA SILVA RIBEIRO, V.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG avidity in active and inactive human neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, p. 211-213, 2009.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clinical Immunology**, v. 91, p. 117–121, 1999.

MANOUTCHARIAN, K.; DÍAZ-OREA, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.; GONZÁLEZ, E.; DE ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GÓMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 99, p. 11-24, 2004.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p.569-579, 2000.

MARTINEZ-OCAÑA, J.; ROMERO-VALDOVINOS, M.; DE KAMINSKY, R. G.; MARAVILLA, P.; FLISSER, A. Immunolocalization of TSOL18 and TSOL45-1A, the successful protective peptides against porcine cysticercosis, in *Taenia solium* oncospheres. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p3, 2011.

MATSUMOTO, M.; HORIUCHI, Y.; YAMAMOTO, A.; OCHIAI, M.; NIWA, M.; TAKAGI, T.; OMI, H.; KOBAYASHI, T.; SUZUKI, M. M. Lipopolysaccharide-binding peptides obtained by phage display method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 54-58, 2010.

MAYROSE, I.; SHLOMI, T.; RUBINSTEIN, N. D.; GERSHONI, J. M; RUPPIN, E.; SHARAN, R.; PUPKO, T. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 69–78, 2007.

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em laboratórios. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2009. p 78-114.

MKUPASI, E. M.; SIKASUNGE, C. S.; NGOWI, H. A.; JOHANSEN, M. V. Efficacy and safety of anthelmintics tested against *taenia solium* cysticercosis in pigs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, e2200, 2013.

MONTANO, S. M.; VILLARAN, M. V.; YLQUIMICHE, L.; FIGUEROA, J. J.; RODRIGUEZ, S.; BAUTISTA, C. T.; GONZALEZ, A. E.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. **Neurology**, v. 65, p. 229–234, 2005.

MORALES, J.; MARTÍNEZ, J. J.; MANOUTCHARIAN, K.; HERNÁNDEZ, M.; FLEURY, A.; GEVORKIAN, G.; ACERO, G.; BLANCAS, A.; TOLEDO, A.; CERVANTES, J.; MAZA, V.; QUET, F.; BONNABAU, H.; DE ALUJA, A. S.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. **Vaccine**, v. 26, p. 2899-2905, 2008.

MORALES-MONTOR, J.; ESCOBEDO, G.; RODRIGUEZ-DORANTES, M.; TÉLLEZ-ASCENCIO, N.; CERBÓN, M. A.; LARRALDE, C. Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 2, p. 233-243, 2004.

MOREIRA, L. O.; SMITH, A. M.; DE FREITAS, A. A.; QUALLS, J. E.; EL KASMI, K. C.; MURRAY, P. J. Modulation of adaptive immunity by different adjuvantantigen combinations in mice lacking Nod2. **Vaccine**, v. 26, p. 5808–5813, 2008.

MOSKOWITZ, J.; MENDELSON, G. Neurocysticercosis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, p. 1560-1563, 2010.

NAKAO, M.; SAKO, Y.; ITO, A. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: a finding of the abbreviated stop codon U. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 633-635, 2003.

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 oedem activity in patients with calcified neurocysticercosis: a prospective cohort and nested case–control study. **Lancet Neurology**, v. 7, p. 1099–1105, 2008.

NDIMUBANZI, P. C.; CARABIN, H.; BUDKE, C. M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y. J.; RAINWATER, E.; DICKEY, M.; REYNOLDS, S.; STONER, J. A. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e870, 2010.

NOGALES-GAETE, J.; ARRIAGADA, C.; SALINAS, R. Tratamiento de la neurocysticercosis: Revisión crítica. **Revista Médica de Chile**, v. 134, p. 789-796, 2006.

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.

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

OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; CABRAL, D. D.; COSTA-CRUZ, J. M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1007-1013, 2007.

OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; GONÇALVES-PIRES, M. do R.; 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.

O'NEAL, S.; WINTHROP, K. L.; GONZALEZ, A. E. Cysticercosis control: bringing advances to the field. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 3, p. 156-160, 2011.

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

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 849-858, 2010.

PARDINI, A. X.; VAZ, A. J.; DOS RAMOS MACHADO, L.; LIVRAMENTO, J. A. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3368-3372, 2001.

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

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

PAWLOWSKI, Z.; ALLAN, J.; SARTI, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 1221-1232, 2005.

PELIZON, A. C.; DENADAI, B.; SCHIAVON, E. V.; MARTINS, D. R.; ZORZELLA, S. F. G.; SARTORI, A. Produção deficiente de citocinas Th1 em camundongos BALB/c jovens. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p.171-176, 2007.

PEÓN, A. N.; ESPINOZA-JIMÉNEZ, A.; TERRAZAS, L. I. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed Research International*, v. 2013, article ID 498583, 13 pages, 2013.

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

PETTY, N. K.; EVANS, T. J.; FINERAN, P. C.; SALMOND, G. P. C. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends in Biotechnology*, v. 25, p. 7-15, 2006.

PRASAD, K. N.; PRASAD, A.; GUPTA, R. K.; NATH, K.; PRADHAN, S.; TRIPATHI, M.; PANDEY, C. M. Neurocysticercosis in patients with active epilepsy from the pig farming community of Lucknow district, north India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 144-150, 2009.

PRETELL, E. J.; MARTINOT JR, C.; GARCIA, H. H.; ALVARADO, M.; BUSTOS, J. A.; MARTINOT, C. Differential diagnosis between cerebral tuberculosis and neurocysticercosis by magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 29, p. 112–114, 2005.

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

RAMÍREZ-ZAMORA, A.; ALARCÓN, T. Management of neurocysticercosis. **Neurological Research**, v. 32, p. 229-237, 2010.

RAMOS-ZÚÑIGA, R.; PÉREZ-GÓMEZ, H. R.; JÁUREGUI-HUERTA, F.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, M. S.; VALERA-LIZÁRRAGA, J. E.; PAZ-VÉLEZ, G.; BECERRA-VALDIVIA, A. Incidental consequences of antihelminthic treatment in the central nervous system. **World Neurosurgery**, v. 79, p. 149-153, 2013.

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.

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

ROBLES, Y.; GONZÁLEZ, E.; GOVEZENSKY, T.; MUNGIA, M. E.; ACERO, G.; BOBES, R. J.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. **Clinical Immunology**, v. 116, p. 265–270, 2005.

RODRIGUEZ-SOSA, M.; DAVID, J. R.; BOJALIL, R.; SATOSKAR, A. R.; TERRAZAS, L. I. Cutting edge: Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 3135-3139, 2002.

ROSAS, G.; FRAGOSO, G.; GARATE, T.; HERNÁNDEZ, B.; FERRERO, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; PARKHOUSE, R. M.; HARRISON, L. J.; BRIONES, S. L.; GONZÁLEZ, L. M.; SCIUTTO, E. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1417-1426, 2002.

SAMOYLOVA, T. I.; NORRIS, M. D.; SAMOYLOV, A. M.; COCHRAN, A. M.; WOLFE, K. G.; PETRENKO, V. A.; COX, N. R. Infective and inactivated filamentous phage as carriers for immunogenic peptides. **Journal of Virological Methods**, v. 183, p. 63-68, 2012.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; HERNÁNDEZ, M.; ROSAS, G.; MARTÍNEZ, J. J.; FLEURY, A.; CERVANTES, J.; ALUJA, A.; LARRALDE, C. Development of the s3pvac vaccine against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: a historical review. **Journal of Parasitology**, Epub ahead of print, 2013.

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.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; TRUEBA, L.; LEMUS, D.; MONTOYA, R. M.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; LOMELI, C.; TAPIA, G.; LARRALDE, C. Cysticercosis vaccine - cross protecting immunity with *t-solium* antigens against experimental murine *t-crassiceps* cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 12, p. 687-696, 1990.

SCIUTTO, E.; ROSAS, G.; HERNÁNDEZ, M.; MORALES, J.; CRUZ-REVILLA, C.; TOLEDO, A.; MANOUTCHARIAN, K.; GEVORKIAN, G.; BLANCAS, A.; ACERO, G.; HERNÁNDEZ, B.; CERVANTES, J.; BOBES, R. J.; GOLDBAUM, F. A.; HUERTA, M.; DIAZ-OREA, A.; FLEURY, A.; DE ALUJA, A. S.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 1368-1378, 2007.

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M. G.; MOLLDREM, J. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1622-1654, 2006.

SHENDEROV, K.; BARBER, D.; MAYER, K.; JANKOVIC, D.; WHITE, S.; CASPAR, P.; HIENY, S.; TRINCHIERI, G.; BESRA, G.; CERUNDOLO, V.; SHER, A. Inflammasome-dependent IL-1 β production is critical for complete Freund's adjuvant-induced helper T cell polarization. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 136-144, 2010.

SILVA, A. V. M.; TAKAYANAGUI, O. M. Teníase e cisticercose. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 245-256.

SILVA, M. R.M.; MAIA, A. A. M.; ESPÍNDOLA, N. M.; MACHADO, L. R.; VAZ, A. J.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 100, p. 192-198, 2006.

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. 229-231, 2002.

SINHA, S.; SHARMA, B. S. Neurocysticercosis: A review of current status and management. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, p. 867–876, 2009.

SINGHI, P. Neurocysticercosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 4, p. 67-81, 2011.

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

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 391-410, 1997.

SMOTHERS, J. F.; HENIKOFF, S.; CARTER, P. Affinity selection from biological libraries. **Science**, v. 298, p. 18, 2002.

SOBNACH, S.; KHOSA, S. A.; PATHER, S.; LONGHURST, S.; KAHN, D.; RAUBENHEIMER, P. J. First case report of pharyngeal cysticercosis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 206-208, 2009.

SOLÍS, C. F.; OSTOA-SALOMA, P.; LUGO-MARTÍNEZ, V. H.; JOHNSTON, S. A.; LACLETTE, J. P. Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1895-1897, 2005.

SOLÍS, C. F.; VÁZQUEZ-TALAVERA, J.; LACLETTE, J. P. Toward development of a *Taenia solium* paramyosin-based vaccine against porcine cysticercosis. **Gaceta Médica de México**, v. 140, n. 2, 129-138, 2004.

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.

SPOLSKI, R. J.; CORSON, J.; THOMAS, P. G.; KUHN, R. E. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. **Parasite Immunology**, v. 22, n. 6, p. 297-305, 2000.

SUZUKI, L. A.; ARRUDA, G. C.; QUAGLIATO, E. M. A. B.; ROSSI, C. 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.

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

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

TANG, L. F.; YI, X. Y.; ZENG, X. F.; WANG, L. Q.; ZHANG, S. K. *Schistosoma japonicum*: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, p. 206-210, 2004.

TERRAZAS, L. I.; BOJALIL, R.; GOVEZENSKY, T.; LARRALDE, C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 74-81, 1998.

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

TOLEDO, A.; LARRALDE, C.; FRAGOSO, G.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K.; HERNÁNDEZ, M.; ACERO, G.; ROSAS, G.; LÓPEZ-CASILLAS, F.; GARFIAS, C. K.; VÁZQUEZ, R.; TERRAZAS, I.; SCIUTTO, E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2522-2530, 1999.

TOENJES, S. A.; SPOLSKI, R. J.; MOONEY, K. A.; KUHN, R. E. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. **Parasitology**, v. 118, p. 623-633, 1999.

TREVISOL-BITTENCOURT, P. C.; SILVA, N. C.; FIGUEREDO, R. Neurocisticercose em pacientes internados por epilepsia no Hospital Regional de Chapecó região oeste do Estado de Santa Catarina. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, p.53-58, 1998.

TSANG, V. C.; BRAND, J. A.; BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of infectious diseases**, v. 59, p. 50-9, 1989.

VALENÇA, M. M.; VALENÇA, L. P. Etiology of the epileptic seizures in Recife city, Brazil: study of 249 patients. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, p.1064-1072, 2000.

VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J. P. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. **Parasitol Research**, v. 89, n. 5, p. 375-378, 2003.

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M. F.; LIVRAMENTO, J. A.; DA SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M. 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.

VÁZQUEZ-TALavera, J.; SOLIS, C. F.; TERRAZAS, L. I.; LACLETTE, J. P. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5412-5416, 2001.

WANG, Q. M.; SUN, S. H.; HU, Z. L.; WU, D.; WANG, Z. C. Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia cysticercosis*. **Vaccine**, v. 21, p. 1672-1680, 2003.

WILLMS, K.; SHOEMAKER, C. B.; SKELLY, P. J.; LANDA, A. Cloning and expression of a Na(+), K(+)-ATPase alpha-subunit from *Taenia solium* (TNaK1alpha). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 79-82, 2004.

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

WILLINGHAM, A. L. 3RD.; ENGELS, D. Control of *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 509-566, 2006.

WU, L.; DIAO, Z.; DENG, X.; GAO, J.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; WANG, Y. DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, p. 1204-1210, 2005.

WHO - World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 25 de julho de 2011.

YANG, W.; LAI, J.; PENG, K.; CHIANG, H.; WENG, C.; SHIUAN, D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. **Journal of Immunological Methods**, v. 304, p. 15-29, 2005.

YAQOOB, N.; UL HAQ, E.; THOMALI, K.; KAMRAN, A.; ZAHARANI, A. Cysticercosis of soft tissue. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 59, p. 108-110, 2009.

ZENKA, J.; PROKOPIC, J. Study on cytochromes from mitochondria of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) cysticerci. **Folia parasitological**, v. 33, p. 145–148, 1986.

ZENKA, J.; PROKOPIC, J. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the larvae of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800). **Folia parasitological**, v. 34, p. 131–136, 1987.

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

ANEXOS

ANEXO 1



Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UFSJ - CEPEA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 43/2010, sobre o projeto intitulado “Avaliação de peptídeos no controle da cisticercose”, sob a responsabilidade da Prof^a. Cristiane Queixa Tilelli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal dispostos na Lei Federal nº 11.794, de 08.10.2008, e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UFSJ - CEPEA em reunião no dia 13 de agosto de 2010.

São João del-Rei, 23 de agosto de 2010.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Leila de Genova Gaya', is positioned above the printed name and title.

Prof^a. Dr^a. Leila de Genova Gaya
Presidente da CEPEA

ANEXO II



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



MI nº 004/2012 – NIT

Uberlândia, 16 de março de 2012.

DE: Prof. Fábio de Oliveira
Diretor de Inovação e Transferência de Tecnologia

PARA: Profa. Júlia Maria Costa Cruz
ICBIM

Assunto: Depósito de Pedido de Patente (informa)

Prezada Professora,

A Diretoria de Inovação e Transferência de Tecnologia, cuja missão é gerir as diretrizes políticas de propriedade intelectual, de inovação e transferência de tecnologia na UFU, informa que o depósito do Pedido de Patente de sua autoria e outros, protocolado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI recebeu despacho, conforme dados:

Patente	PI 1006638-1 A2
Inventor(a)	Julia Maria Costa Cruz e outros
Título	"Peptídeos Marcadores Das Fases Clínicas Da Neurocisticercose"
Natureza	Patente de Invenção
Data	22/11/2010
Despacho	2.1 Notificação de depósito de Pedido de Patente (Revisia RPI n. 2141– 17/01/2012)

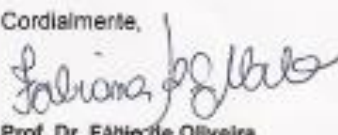
Nos termos da Lei da Propriedade Industrial (Lei n. 9.279/96), para que resguarde os direitos do inventor, o processo deve ser mantido sob sigilo por 18 meses, a partir da data do depósito. Não publicar nem divulgar detalhes da patente neste período.

Solicitamos dar ciência e conhecimento aos demais inventores.

A Agência Intelecto acompanhará a tramitação do processo, o cumprimento de prazos e exigências junto ao INPI.

Mais uma vez, gostaríamos de cumprimentá-los por esta importante iniciativa, que contribui significativamente para a consolidação da pesquisa em nossa Universidade.

Cordialmente,



Prof. Dr. Fábio de Oliveira
Diretor de Inovação e Transferência de Tecnologia

Agência Intelecto
 Campus Santa Mônica – Reitoria - Av. João Naves de Ávila, 2121
 38400-902 – UBERLÂNDIA – MG
 Fone: (34) 3239 4977 - E-mail: diretoria@intelecto.ufu.br

APÊNDICES

APÊNDICE I

Dados morfométricos dos animais grupo 1, imunizados com bacteriófago Cc48, nos pontos de desafio e de sacrifícios. Pesos expresso em gramas (g) e as outras medidas em centímetros (cm).

Grupo 1 - dpi 15									
DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	21.6	8.5	10	18.5	1	24.6	8.5	11	20
2	24.8	8.5	10.5	19.5	2	27.5	9	10.5	19.5
3	25.5	9	11	20	3	27.3	9	11	19.5
4	23.2	8.5	10	19	4	25.8	9.5	10	19
5	25.1	9	11	20	5	26.7	9	10.5	19.5
6	25.1	9	11	20	6	22.4	8	10.5	19
7	24.4	9	10.5	20	7	25.9	8.5	11	20.5
8	25.7	9	10.5	20.5	8	26.9	8.5	11	20
9	25.3	9	10.5	19.5	9	26.3	9	11	20
10	25.3	9	10.5	19.5	10	27.6	9	10.5	19
MÉDIA	24.6	8.9	10.6	19.7	MÉDIA	26.1	8.8	10.7	19.6
Grupo 1 - dpi 30									
DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	25.4	9	11	20	1	28.2	9.5	11	19.5
2	23.9	8.5	10.5	20	2	31.5	10	11	20.5
3	23.7	9	10	19	3	28.4	10	10.5	19.5
4	24.7	8.5	11	20	4	32.3	9.5	11	20.5
5	24.2	9	10	19.5	5	26.4	9.5	11	20
6	24.1	9	10.5	19	6	25.1	8.5	10.5	19.5
7	24.8	9	10	19	7	26.5	8.5	10.5	19.5
8	24.9	9	10	18.5	8	24.4	8	10	19.5
9	24.2	9	10.5	20	9	25.3	9	10.5	19.5
10	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	10	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
MÉDIA	24.4	8.9	10.4	19.4	MÉDIA	27.6	9.2	10.7	19.8
Grupo 1 - dpi 45									
DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	23	8.5	10.5	19	1	36.8	10.5	10.5	19.5
2	26.1	9	11	20	2	29.4	9.5	10.5	20
3	23.1	8.5	10.5	19.5	3	32.2	9.5	10.5	19.5
4	24.6	8.5	10.5	19	4	25	8.5	10.5	19
5	23.9	9	10.5	19.5	5	25	8.5	10.5	19
6	22.6	8.5	10.5	19	6	42.3	11.5	11	20.5
7	25.1	9	10.5	19.5	7	38.7	11.5	11	20.5
8	24.7	9	11	20	8	37.1	11.5	10.5	19.5
9	23.4	9	10	19	9	37.1	11	10.5	19.5
10	24.6	8.5	11	19.5	10	39.3	11.5	10.5	19

MÉDIA	24.1	8.8	10.6	19.4	MÉDIA	34.3	10.4	10.6	19.6
Grupo 1 - dpi 60									
DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	25.5	9	10.5	19.5	1	50.5	12	10	18
2	24.3	9	10	19.5	2	44.6	12	10.5	19
3	23.4	9	10.5	19	3	45.8	11	10.5	19.5
4	24.4	9	10.5	20	4	45.5	11	10.5	19
5	22.4	8.5	10	18.5	5	41.8	11.5	10.5	19
6	23.6	9	10	19	6	47.6	12	11	19
7	25.8	9	11	20	7	39.5	11	11	19
8	23.3	8.5	10.5	19.5	8	37.5	11	10.5	20
9	24.5	9	11	19	9	40.6	12	11	20
10	25.1	9	11	19.5	10	38.4	12	11	20
MÉDIA	24.2	8.9	10.5	19.4	MÉDIA	43.2	11.6	10.7	19.3

dpi = dias após infecção.

N.C. = não consta.

C.A. = circunferência abdominal.

T.C.S.C. = tamanho corporal sem a cauda.

T.C.T = tamanho corporal total.

DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	25.9	8.5	8.5	18.2	1	27.3	10	10	19
2	26.7	8.5	8.5	18.2	2	22.4	8	10	20
3	26.9	8.5	8.5	18.2	3	24.7	8.5	9.5	20
4	23.8	8.5	8.5	18.2	4	22.3	9	9.5	19
5	24.1	8.5	8.5	18.9	5	25.2	8.5	9.5	19
6	24	8.5	8.5	18.9	6	25.1	9.5	10	20
7	23.6	8.5	8.5	18.9	7	26.1	9	10	19
8	23.3	8.5	8.5	18.9	8	26.9	9	9.5	20
9	24.2	8.5	8.5	19	9	24.4	9	10	20
10	26	9.8	10	19.7	10	24.8	8.5	9.5	19.5
MÉDIA	24.9	8.63	8.65	18.71	MÉDIA	24.9	8.9	9.8	19.6

dpi = dias após infecção.

C.A. = circunferência abdominal.

T.C.S.C. = tamanho corporal sem a cauda.

T.C.T = tamanho corporal total.

N.C. = não consta.

DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	26	8.5	10.5	20.5	1	26.4	9	11	20.5
2	25.3	8	10.5	20	2	24.5	9.5	10	19.5
3	25.3	8	10.5	19.5	3	27.1	9	10	20
4	24.2	8.5	10.5	19.5	4	27.5	9	10.5	21
5	25.6	9	10.5	20	5	26.4	8.5	10.5	20
6	24.5	8.5	10.5	20.5	6	23.6	9	9.5	19.5
7	26.9	9.5	11	21	7	28.2	9	10.5	20.5
8	21.7	8	10	19	8	32.6	12	9.5	19
9	24.1	8	10.5	20	9	24.9	8.5	9	19
10	23.1	8	10.5	19.5	10	31.1	10	10.5	20
MÉDIA	24.7	8.4	10.5	20.0	MÉDIA	27.2	9.4	10.1	19.9

dpi = dias após infecção.

C.A. = circunferência abdominal.

T.C.S.C. = tamanho corporal sem a cauda.

T.C.T = tamanho corporal total.

DESAFIO					SACRÍFICIO				
Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T	Animal	Peso	C.A.	T.C.S.C.	T.C.T
1	21.9	8	8.5	18.2	1	26.9	9	10.5	21.5
2	24.6	8.5	8.5	18.2	2	24.7	8.5	9.5	20
3	23.5	8	8.5	18.2	3	25.3	8	10.5	21
4	24.5	8.5	8.5	18.2	4	23	8.5	9.5	20
5	25	8.5	8.5	18.9	5	24.1	8	10	19.5
6	24.6	8.5	8.5	18.9	6	24.9	8	10	20.5
7	27.5	8.5	8.5	18.9	7	28.1	9	10.5	21
8	25.6	8	8.5	18.9	8	27.3	8.5	10	21
9	23.5	8.5	8.5	19	9	24.2	7	10	20.5
10	27	9	10	19.7	10	26.6	9	10.5	21
MÉDIA	24.8	8.4	8.7	18.7	MÉDIA	25.5	8.4	10.1	20.6

dpi = dias após infecção.

C.A. = circunferência abdominal.

T.C.S.C. = tamanho corporal sem a cauda.

T.C.T = tamanho corporal total.

N.C. = não consta.