1. INTRODUÇÃO

O Filo Platyhelminthes, Classe Cestoidea, Ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae inclui os parasitos do gênero *Taenia* spp que apresenta 42 espécies e três subespécies, sendo que, em 35 dessas espécies, o ciclo de vida já completo está descrito (LOSS-FRANK, 2000; HOBERG, 2006). Estima-se que a associação entre *Taenia* spp e os hominídeos ocorreu há cerca de 10.000 anos atrás na África. Anteriormente, os hospedeiros definitivos eram hienas (*Taenia solium*, Linnaeus, 1758) e felídeos (*Taenia saginata*, Goeze, 1782 e *Taenia asiatica*) conforme demonstrado na Figura 1. A partir da domesticação de suínos e bovinos, como a principal fonte alimentar de origem animal, a dispersão da infecção humana se intensificou (HOBERG, 2002; HOBERG, 2006).

Os tenídeos possuem corpos achatados dorso-ventralmente e divididos em escólex, colo e estróbilo. O escólex é o órgão de fixação do Cestoda na mucosa intestinal, apresentando quatro ventosas, formadas de tecido muscular, arredondadas e proeminentes. O parasito *T. solium* possui um rostelo ou rostro armado com 25 a 50 acúleos ou ganchos; *T. saginata* e *T. asiatica* não possuem o rostelo. O colo está situado imediatamente abaixo do escólex, não tem segmentação, constituindo a zona de crescimento ou de formação de proglotes. O estróbilo ou corpo do helminto, composto pela união de proglotes (segmentos ou anéis), as quais se subdividem em jovens, maduras e grávidas, de acordo com o desenvolvimento dos órgãos reprodutores. As proglotes grávidas são aquelas que apresentam o útero hipertrofiado contendo ovos (REY, 2001).

A teníase ocorre devido ao parasitismo de adultos das espécies *T. solium*, *T. saginata* ou *T. asiatica* no intestino delgado humano. Essas espécies apresentam ciclos de vida do tipo heteroxeno, sendo o suíno o hospedeiro intermediário de *T. solium* e de *T. asiatica*, e o bovino constitui o hospedeiro intermediário de *T. saginata* (SOTELO, DEL BRUTTO, 2000; PAWLOWSKI, ALLAN, SARTI, 2005). A teníase é adquirida pela

ingestão de carne crua ou mal cozida de suíno ou de bovino infectados, sendo assintomática ou oligossintomática. O diagnóstico de teníase é realizado pelo encontro de ovos ou proglotes que são eliminados nas fezes após quatro meses do início da infecção (FLISSER, 2006).

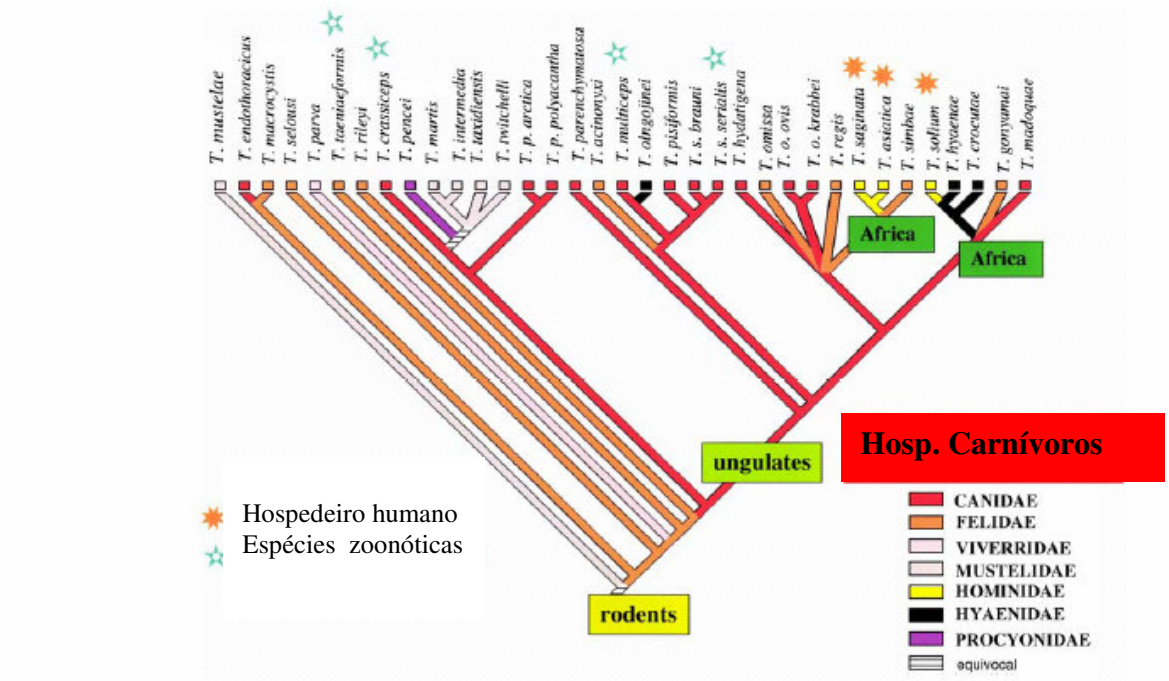

Figura 1 – Árvore filogenética e hospedeiros carnívoros associados com espécies de *Taenia* spp (HOBERG, 2006).

Os ovos das três espécies são morfologicamente idênticos, portanto o diagnóstico pela detecção desse estágio é fornecido pela categoria taxonômica de gênero. A diferenciação morfológica entre essas espécies é realizada pela presença de rostelo no escólex de *T. solium*, estrutura ausente nas outras duas espécies e a partir do número e tipo de ramificações uterinas das proglotes grávidas, sendo que *T. solium* apresenta de 7-11 ramificações laterais a partir do ramo central do útero e do tipo dendríticas; em *T. saginata* e *T. asiatica* essas ramificações apresentam mais que 12 ramos laterais e são do tipo

dicotômicas (YANCEY, DIAZ-MARCHAN, WHITE, 2005; ÁVILA et al., 2006). A distinção entre *T. saginata* e *T. asiatica* pode ser feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se "primers" específicos. Os metacestódeos (estágios larvais) de *T. asiatica* apresentam tropismo visceral no hospedeiro intermediário, fato não observado na infecção por *T. solium* (GALÁN-PUCHADES, FUENTES, 2000).

O diagnóstico parasitológico da teníase apresenta 60% de sensibilidade, devido aos métodos empregados e a ausência de eliminação de ovos/proglotes por longos períodos durante a infecção (ALLAN, CRAIG, 2006). Esses fatos, aliados ao diagnóstico não específico, representam limitações aos estudos epidemiológicos e a implementação de estratégias de controle do Complexo Teníase/Cisticercose. O desenvolvimento de ensaios para detecção de antígenos específicos em amostras de fezes humanas e de anticorpos específicos contra o estágio adulto desses parasitos representa tecnologia de aplicação potencial no controle dessa infecção (SCHANTZ, 2006, NUNES et al., 2006).

A teníase por *T. asiatica* foi descrita no final da década de 80 e apresenta índices endêmicos, principalmente na Tailândia e na China, e esse parasito possui semelhança filogenética com *T. saginata*, sendo considerado como uma subespécie por Fan (1988) e, posteriormente, caracterizada como uma espécie por Eom, Rim (1993) no entanto, persistem ainda questionamentos sobre a taxonomia desse parasito e a definição de subespécie de *T. saginata* ou a classificação como uma espécie independente, necessitando de análises em maior número de amostras do parasito (MCMANUS, 2006).

Dentre esses parasitos, somente *T. solium* apresenta ovos com a capacidade de infectar e ocasionar cisticercose (infecção pela larva, metacestódeo ou cisticerco) no homem, que é caracterizado como hospedeiro acidental no ciclo de vida do parasito (GALÁN-PUCHADES, FUENTES, 2000; PAWLOWSKI, ALLAN, SARTI,

2005). A forma adulta do parasito pode medir de um e meio a quatro metros de comprimento e sobrevive em média três anos no hospedeiro. Cada proglote grávida de *T. solium* produz cerca de 50.000 ovos férteis (WEBBE, 1994). As formas metacestódeas sobrevivem em diferentes mamíferos (suíno, cão, macacos e homem) porém, os adultos somente se desenvolvem no homem (ITO, 2002; YANCEY, DIAZ-MARCHAN, WHITE, 2005). O "hamster" e o "gerbil", tratados com drogas imunossupressoras, atuam como modelos experimentais eficientes para o desenvolvimento de adultos desse parasito (ÁVILA et al., 2006).

Os suínos adquirem a cisticercose principalmente através da coprofagia. Recentemente, Copado et al. (2004) demonstraram que os suínos se organizam em sistema de hierarquia, apresentam forte coesão entre o grupo e dinâmica social que exercem influência na transmissão de parasitos. Observaram que os suínos adultos, líderes do grupo, são os primeiros a terem acesso às fezes e ingerem grande quantidade, restando pouco para os outros. Através de uma série de experimentos controlados, Gonzalez et al. (2005) forneceram proglotes grávidas de *T. solium* a um suíno e ele foi capaz de infectar o segundo suíno, demonstrando portanto, que a transmissão suíno-suíno é possível, porém o impacto desse fato ainda não foi avaliado (GARCIA, DEL BRUTTO, 2005).

O ovo de *T. solium*, ingerido pelo suíno ou homem, sofre a ação do suco gástrico e, no intestino delgado, ocorre liberação da oncosfera ou embrião que atravessa a parede intestinal e através da corrente sangüínea migra para os tecidos. Os metacestódeos se desenvolvem nos músculos esquelético e cardíaco, nos olhos e no sistema nervoso central (SNC) desses hospedeiros (FLISSER, MADRAZO, DELGADO, 1997; GARCIA et al., 2003).

A transmissão da cisticercose humana relaciona-se à falta de saneamento básico, maus hábitos de higiene pessoal e ao destino inadequado das fezes

humanas. A principal forma de infecção é a transmissão pelo contato indireto, através da ingestão de alimentos e/ou água contaminados por fezes ou, diretamente, através das mãos de indivíduo com teníase por *T. solium* (hetero-infecção) (GARCIA, DEL BRUTTO, 2005). Os indivíduos com infecção por parasitos adultos de *T. solium* podem se contaminar pela falta de higiene pessoal ou por regurgitação e posterior ingestão de proglotes do parasito (auto-infecção). Os vegetais que são ingeridos crus podem ser contaminados por ovos de parasitos através da irrigação com água contaminada ou pela própria adubação com fezes humanas (AGAPEJEV, 2003, GARCIA, DEL BRUTTO, 2005).

O metacestódeo de *T. solium* é constituído por uma vesícula membranosa, contendo líquido no seu interior; o escólex invaginado com quatro ventosas, apresenta rostelo com duas fileiras de ganchos ou acúleos e o colo. Essas larvas podem atingir até 12 mm de comprimento, após quatro meses de infecção. O metacestódeo, durante seu desenvolvimento nos tecidos do hospedeiro passa por quatro etapas: **a) etapa vesicular** – metacestódeo viável, apresenta uma membrana transparente contendo líquido e o escólex invaginado em seu interior; áreas de tegumento do parasito apresentam-se, histologicamente, intactas e outras áreas podem ser vistas com reação inflamatória e discreta gliose. Nessa primeira etapa, a resposta imune pode variar da tolerância até intensa resposta inflamatória; **b) etapa vesicular coloidal** – a vesícula aparece mais espessa e com líquido turvo ou fracamente gelatinoso, esbranquiçado e a larva fragilizada. O escólex apresenta sinais de degeneração hialina. No tegumento do parasito observam-se alterações, tais como infiltrado inflamatório com linfócitos, neutrófilos, monócitos e histiócitos, além de fibroblastos e fibras colágenas. No tecido do hospedeiro, as arteríolas vizinhas ao parasito apresentam arterite e necrose fibrinóide na túnica média. Eventualmente, encontra-se oclusão completa da luz vascular por proliferação endoarterial ou por um trombo; **c) etapa granular-nodular** – a vesícula tende a reduzir seu tamanho, seu conteúdo torna-se

semi-sólido e o metacestódeo não está viável. O escólex é transformado em um grânulo mineralizado. O infiltrado inflamatório é composto por células mononucleares e é possível visualizar os restos do parasito. **d) etapa nodular calcificada** – é a etapa final, após a morte do metacestódeo, que consiste em um nódulo sólido mineralizado, circundado totalmente por tecido conjuntivo denso não modelado. Os constituintes do parasito não são identificados (SOTELO, GUERRERO, RUBIO, 1985; ESCOBAR-IZQUIERDO, 1988; LINO JÚNIOR et al., 2002).

As formas clínicas sintomáticas prevalentes incluem a infecção do SNC ou neurocisticercose (NC) e a cisticercose ocular. A NC humana apresenta período de incubação de dois a cinco anos (GARCIA, DEL BRUTTO, 2005). As manifestações clínicas da NC dependem do local anatômico onde se encontram os metacestódeos, das características das lesões (número de metacestódeos presentes e a fase de desenvolvimento dos mesmos) e da intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro (DEL BRUTTO, SOTELO, 1988; DEL BRUTTO*,* 1999; PAL, CARPIO, SANDER, 2000).

A NC apresenta multiplicidade de sinais e sintomas cerebrais decorrentes dos fenômenos mecânicos, obstrutivos e degenerativos, que ocorrem durante o processo inflamatório crônico (DEL BRUTTO*,* 1999). As convulsões predominam em 50 a 80% dos pacientes com NC parenquimatosa. O processo inflamatório local gera a hipertensão intracraniana cujos sintomas mais comuns incluem a cefaléia, náuseas e vômitos. Os pacientes podem apresentar também hidrocefalia, vasculite, parestesia, meningite e alterações de comportamento, incluindo a confusão e a demência (AGAPEJEV, 1996; DORNY et al., 2003; HAWK et al., 2005). Na Índia e nos Estados Unidos verifica-se que são mais freqüentes pacientes com uma única lesão visualizada em exames de neuro-imagens. Na América Latina a presença de múltiplas lesões

parenquimatosas predomina em pacientes com NC (YANCEY, DIAZ-MARCHAN, WHITE, 2005).

A NC foi classificada em ativa ou inflamatória e inativa ou não-inflamatória, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos metacestódeos visualizados por testes de neuro-imagens associados à presença ou ausência de resposta imune do hospedeiro (SOTELO, GUERRERO, RUBIO, 1985). Analisando a relação entre a forma ativa ou inativa da NC e o tipo de resposta imune presente, Bueno et al. (2004) demonstraram que na forma inflamatória ou ativa, o padrão de resposta imune presente é T "helper" (Th)1 e na forma não-inflamatória ou inativa é do tipo misto (Th1/Th2). Os pacientes assintomáticos apresentam a resposta imune protetora do tipo Th2 (CHAVARRÍA et al., 2005).

1.1. Epidemiologia da Cisticercose Humana

A cisticercose é uma zoonose re-emergente nos países em desenvolvimento e emergente nos países desenvolvidos. A NC é a principal causa de epilepsia na América Latina (WHITE JR., 2000; EDDI, NARI, AMANFU, 2003).

A prevalência mundial é de, aproximadamente, 50 milhões de indivíduos infectados por *T. solium* e estima-se que ocorram cerca de 50 mil mortes anuais devido à NC (EDDI et al., 2006).

Essa zoonose apresenta características que permitem sua erradicação a longo prazo, pois o homem é o único hospedeiro definitivo descrito. Para se alcançar esse objetivo, os fatores culturais, políticos e econômicos envolvidos na manutenção dessa parasitose devem sofrer alterações visando a interrupção do ciclo biológico de *T. solium* (GONZALEZ et al., 2003).

A Organização Panamericana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 1994) consideram os índices de 1% para teníase humana, 0,1% para cisticercose humana e de 5% para cisticercose animal como endêmicos. O Complexo Teníase/Cisticercose é um problema de saúde pública na América Latina. O processo de globalização contribuiu para a rápida dispersão de doenças transmissíveis entre os países envolvidos. Diante desta situação, o "Center for Disease Control and Prevention" (CDC), órgão de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (EUA) criou um programa de saúde global que envolve o intercâmbio de informações e de assistência em doenças infecciosas, visando a prevenção e/ou a limitação da transmissão de doenças importadas (SCHANTZ, TSANG, 2003).

A NC é endêmica na América do Sul, México, América Central, Papua Nova Guiné, Ásia (China, Índia e Indonésia), África do Sul e na Europa Oriental (Polônia e Romênia); porém, considerada rara na Europa (central e leste), Ilhas do Caribe (exceto Haiti), cone sul da América do Sul e no Canadá e EUA. A NC não é comum na Austrália, Japão, Nova Zelândia e Ilhas do Pacífico. Essa neuroparasitose é ausente em Israel e alguns países do norte da África, no leste do Mediterrâneo e na Ásia central, locais onde não se consome carne suína, por motivos religiosos (ITO, 1997; ANTONIUK, 1999; ROMÁN et al., 2000; EDDI et al., 2006).

1.2. Utilização da Biologia Molecular no Estudo de *T. solium*

Os avanços da tecnologia molecular têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a especificidade dos ensaios aplicados ao diagnóstico da cisticercose, humana e suína, para a produção de vacinas eficazes na prevenção dessas parasitoses e para análises filogenéticas (MCMANUS, 1990; PLANCARTE et al., 1999; GAUCI, LIGHTOWLERS, 2001).

Dentre os marcadores de membrana salienta-se o glicolipídeo GSL-I (glycosphingolipid-I) que é uma β-galactopyranosyl-1-ceramide, uma molécula de ceramida que se relaciona à imunomodulação. As diferentes composições lipídicas das glicosilceramidas têm sido postuladas como reguladoras da transição morfológica, estágios de desenvolvimento, diferenciação, oncogênese e estabilidade de membrana de tenídeos (WUHRER et al., 2000). A molécula de GSL-I, no entanto, não apresentou valor no diagnóstico imunológico da NC, pelo teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) porque indivíduos saudáveis ou com outras alterações neurológicas apresentaram anticorpos anti-GSL-I em amostras de soro (LÓPEZ-MARÍN et al., 2002). A clonagem da proteína F18 de metacestódeos de *T. solium* foi realizada e, por ELISA, essa proteína apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 100% na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro de indivíduos com NC crônica (MONTERO et al., 2003).

A tecnologia do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) recombinante pode ser uma resposta para se obter antígenos específicos de *T. solium*, detectáveis em qualquer estágio de vida do parasito. A purificação desses antígenos, com alta capacidade de discriminação sorológica entre cisticercose, teníase e hidatidose representa a chave para o diagnóstico imunológico dessas parasitoses (ITO et al., 2003). O desenvolvimento de vacinas contra cisticercose, através de técnicas de DNA recombinante permite uma elevada produção de antígenos, como o TSOL 18 que estimulou resposta imune protetora contra o desenvolvimento de metacestódeos em suínos vacinados (LIGHTOWLERS, 2003). A glicoproteína de 50 kDa (GP50), presente em *T. solium,* foi caracterizada e clonada por Hancock et al. (2004) que demonstraram 90% de sensibilidade da GP50 no imunodiagnóstico da cisticercose humana em amostras de soros no teste ELISA.

No Brasil, Bueno et al. (2005) utilizando a GP50 recombinante, teste ELISA e amostras pareadas de soro e LCR de 64 de pacientes com NC obtiveram

sensibilidade de 94,7 e 100% e especificidade de 93,8 e 100% em soro e LCR, respectivamente. Nesse mesmo estudo, utilizaram a proteína sintética de 8 kDa, que apresentou sensibilidade e especificidade inferiores aos obtidos com a GP50 recombinante. Através da análise de isoenzimas de isolados de *T. solium* originários do México e da Colômbia, Maravilla et al. (2003 a) demonstraram diferença na migração de cinco isoenzimas deste parasito, sugerindo diferenças regionais entre os isolados.

O diagnóstico diferencial entre as espécies de cestodas relacionadas à teníase humana é importante para a epidemiologia, o tratamento e o acompanhamento do paciente. Várias metodologias têm sido propostas para esta finalidade, Yamasaki et al. (2004) descreveram a aplicação do teste "PCR Multiplex", em amostras de fezes de pacientes com teníase, capaz de discriminar entre as espécies: *T. solium*, *T. saginata* e *T. asiatica*. No Brasil, Jardim et al. (2006) desenvolveram os "primers" TBR (3, 4, 5 e 6) a partir da seqüência de nucleotídeos do gene da subunidade maior do ribossomo (LSU RNAr) de tenídeos e demonstraram a eficiência desses "primers" na diferenciação entre *T. solium* e *T. saginata* por "PCR Duplex" em amostras de fezes humanas.

A variabilidade genética de uma espécie se baseia na presença de polimorfismo no DNA associado a diferenças de infectividade e de patogenia, aspectos responsáveis por variações na epidemiologia da doença. O polimorfismo representa variações na seqüência "padrão" dos genes, sem causar alteração funcional na proteína codificada. Há três tipos de polimorfismo: **sítio-específico** – as variações estão presentes em um gene específico; **mini-satélite** – as variações estão entre 28 e 32 pares de bases (pb) que se repetem em um número variado de vezes (5 a 200 vezes), geralmente na extremidade 3' do DNA; **micro-satélite** – quando ocorrem repetições de 1 a 5 pb, que ocorrem em número variado de vezes, também chamadas "tandem repeats". O

polimorfismo sítio-específico pode ser detectado pela presença de sítios de enzimas de restrição pelo teste RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (LEWIN, 2000).

O DNA mitocondrial (mt-DNA) constitui-se em excelente marcador nuclear no estudo de polimorfismo, pois apresenta elevada variabilidade, pode ser facilmente qualificado e não sofre pressão seletiva proveniente dos hospedeiros. Os genes para as proteínas citocromo c (*cox1*) e oxidase 1 foram seqüenciados em isolados de *Taenia* spp e demonstraram que *T. asiatica* deve ser considerada como uma espécie distinta. A análise de polimorfismo no gene relacionado com a síntese da proteína citocromo b (*cob*) do mt-DNA de tenídeos permitiu a diferenciação entre os genótipos de *T. solium*, *T. saginata* e *T. asiatica.* A análise molecular do mt-DNA permitiu a classificação de *T. solium* em dois genótipos, sendo um da Ásia e outro da África e América Latina (NAKAO et al., 2002).

A presença de polimorfismo em isolados de *T. solium*, provenientes do México e isolados de *T. saginata*, da Espanha, México e Quênia foi analisada pela técnica de RFLP e os resultados obtidos demonstraram polimorfismo apenas no isolado de *T. saginata* do Quênia (GONZALEZ et al., 2002).

A aplicação da PCR propicia a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito em isolados com o uso de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) espécie-específicos (BARKER, 1989; McMANUS, 1990). Para a análise de organismos, cujas seqüências de DNA são desconhecidas, a PCR específica apresenta um fator limitante: requer o conhecimento dos nucleotídeos que compõem as duas extremidades da seqüência de DNA que se deseja amplificar. No início da década de 90 foi descrita uma variação da técnica de PCR que foi denominada de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”). Essa técnica foi desenhada para contornar o problema do conhecimento prévio da seqüência de DNA que se deseja amplificar, cuja modificação

baseia-se na utilização de apenas um “primer” (decâmero) na reação, alterando-se as condições específicas de amplificação da reação. A variação possibilita que ocorra amplificação ao acaso de segmentos de DNA, no genoma. Na RAPD ocorre o anelamento do “primer” em pontos próximos do genoma, delimitando a região que será amplificada (WILLIAMS et al., 1990; WELSH, McCLELLAND, 1990).

A tecnologia da RAPD apresenta diversas aplicações: diferenciação de linhagens de uma espécie; estimativa de variabilidade em Bancos de Germoplasma; estudo de estrutura genética de populações; estimativa de parâmetros genéticos e análise de paternidade (KAZAN, MANNERS, CAMERON, 1993).

As linhagens representam um passo evolutivo para o surgimento de novas espécies de seres vivos. As diferentes linhagens descritas em tenídeos, *Echinococcus granulosus* e *E. multilocularis* apresentam distintos graus de infectividade para animais e homem, com implicações na epidemiologia da hidatidose (THOMPSON, 1995).

As amostras de metacestódeos de *T. solium* de duas localidades do México e de Madagascar (África) foram analisadas por RAPD e apresentaram diferenças genéticas com 43,36% de polimorfismo e variabilidade genética no DNA do parasito entre as duas localidades mexicanas e entre os países amostrados (VEGA et al., 2003).

Pela utilização da tecnologia da RAPD foi possível identificação de linhagens ou de marcadores espécie-específicos em protozoários: *Eimeria* spp (PROCUNIER, FERNANDO, BARTA, 1993), *Trypanosoma* spp (WAITUMBI, MURPHY, 1993), *Trypanosoma rangeli* (STEINDEL et al., 1994) e *Leishmania* spp (NOYES, BELLI, MAINGON, 1996). Utilizando esse teste, vários autores demonstraram a presença de polimorfismo em helmintos: *E. granulosus* (SCOTT, McMANUS, 1994; ROSENZVIT et al., 1999; MWAMBETE, PONCE-GORDO, CUESTA-BANDERA,

2004), *Schistosoma* spp (BARRAL et al., 1993), *Schistosoma haematobium* (KAUKAS et al., 1994), *Trichinella* spp (ZARLENGA, LA ROSA, 2000) e *Fasciola hepatica* (RAMADAN, SABER, 2004).

1.3. Diagnóstico Imunológico da Cisticercose Humana

O diagnóstico da NC humana é determinado após a análise de dados clínicos, epidemiológicos, de neuro-imagens e imunológicos. Os critérios (absolutos, maiores, menores e epidemiológicos) para a definição do diagnóstico da cisticercose e da NC foram estabelecidos por Del Brutto et al. (1996) e revisados por Del Brutto et al. (2001). Esses critérios classificaram o diagnóstico da NC em definitivo ou provável, no entanto, os mesmos não foram vastamente avaliados em países onde a NC é endêmica. Por exemplo, em países indianos é necessário o diagnóstico diferencial com os tuberculomas, uma vez que pacientes com tuberculose neural podem apresentar sintomas semelhantes aos descritos para NC (YANCEY, DIAZ-MARCHAN, WHITE, 2005).

As amostras de saliva, sangue de punção digital, soro e de líquido cefalorraquidiano (LCR) são os principais fluidos biológicos utilizados para o diagnóstico da cisticercose (SCIUTTO et al., 2000; GARCIA et al., 2003).

Os estudos de neuro-imagens incluem a Tomografia Computadorizada (TC) e a Ressonância Magnética (RM) e são “gold standard” para o diagnóstico de NC somente quando o escólex do parasito é visualizado. A TC é utilizada no estudo de lesões parenquimatosas, na identificação das formas ativa e inativa da NC e permite a orientação e localização das lesões no SNC. A RM propicia melhor visualização de lesões na base do cérebro, nos ventrículos e na medula espinhal, permitindo uma avaliação precisa da reação inflamatória que circunda o parasito e a utilização de contraste, aumenta a resolução e a capacidade de identificação de lesões não visualizadas pela TC. A principal limitação da

RM é a falha na detecção de pequenos granulomas e de calcificações. O escólex do parasito em etapa de degeneração, usualmente não é visualizado por TC ou RM, criando confusão no diagnóstico diferencial com outras infecções ou neoplasias do SNC. Recentemente, foi criada a RM por difusão pesada ou FLAIR ("Fluid-Attenuated Inversion Recovery") que permite a visualização dessas lesões, portanto, para um diagnóstico mais eficaz faz-se necessário utilização dos dois procedimentos. Devido ao alto custo desses exames, principalmente em países em desenvolvimento, essas tecnologias não estão disponíveis para a maioria da população (SCIUTTO et al., 2000; GARCIA, DEL BRUTTO, 2005)

No diagnóstico imunológico da NC humana já foram utilizadas várias metodologias: a primeira foi a clássica reação de fixação de complemento (WEINBERB, 1909), que até a década de 80 representou importante ferramenta no auxílio diagnóstico com a reatividade sorológica incorporada à síndrome liquórica da NC. A reação de hemaglutinação indireta não constitui ferramenta eficiente no diagnóstico da NC devido à grande freqüência de resultados falso-positivos que apresenta e à dificuldade na padronização dos regentes (SCIUTTO et al., 2000). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) constitui uma alternativa que apresenta estabilidade dos seus reagentes e detecta anticorpos contra antígenos de superfície de metacestódeos de *T. solium*, empregando tanto cortes do parasito, quanto antígenos particulados (MACHADO, CAMARGO, HOSHINO, 1973).

A introdução do método ELISA representou um grande avanço no diagnóstico da cisticercose humana (COSTA et al., 1982) e suína (BIONDI et al., 1996; SCIUTTO et al., 2000). Esse teste apresenta elevados índices de sensibilidade, permite a análise de grande número de amostras simultaneamente, os reagentes são estáveis, a especificidade é alta e a leitura dos resultados é automatizada. A utilização de diferentes

frações antigênicas de metacestódeos de *T. solium* tais como o extrato salino total, líquido de vesícula, extrato alcalino total, extrato de escóleces ou de membrana do parasito, resulta em diferenças de sensibilidade e especificidade do teste (COSTA, 1986).

Os anticorpos demonstrados em amostras biológicas de pacientes com NC pertencem as classes IgG, IgM, IgA e IgE; sendo que os anticorpos da classe IgG apresentam maior prevalência durante a fase crônica da infecção (ESPINOZA et al., 1986; SHORT et al., 1990; SCIUTTO et al., 2000).

O teste "Western Blotting" (WB) envolve a separação de antígenos por eletroforese "Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis" (SDS-PAGE) que, posteriormente, são transferidos para membrana de nitrocelulose, permitindo o reconhecimento de anticorpos contra os antígenos fixados na nitrocelulose (BRAND, TSANG, 1989). A purificação de antígenos glicoprotéicos de metacestódeos de *T. solium* e a utilização desses no teste "Enzyme Linked Immunoelectrotransfer Blot" (EITB) foram padronizados por Tsang, Brand, Boyer (1989) apresentando sensibilidade e especificidade elevadas no diagnóstico de NC, tanto em amostras de soro quanto em LCR. No entanto, quando o paciente apresenta somente lesões calcificadas ou uma única lesão viável no SNC, a sensibilidade do EITB é baixa. A maior parte dos estudos epidemiológicos que utilizaram o EITB na detecção de anticorpos contra *T. solium* foram realizados em países da América Central e Sul, porém, a aplicação desse teste é limitada em alguns países porque apresenta complexidade no método de purificação das glicoproteínas e esses antígenos não podem ser utilizadas no ELISA, que constitui tecnologia de mais fácil acesso nos países em desenvolvimento. A combinação do ELISA e o WB na detecção de anticorpos específicos em amostras de soro e de LCR de pacientes com NC, frente aos extratos totais de metacestódeos de *T. solium*, representam uma alternativa mais viável nos países em desenvolvimento (PAWLOWSKI, ALLAN, SARTI, 2005).

No Brasil, através de um estudo soroepidemiológico realizado no Distrito Federal, a soroprevalência da cisticercose foi estimada nas diversas regiões geográficas e os resultados obtidos demonstraram 8,1% de sorologia positiva em amostras provenientes de indivíduos da região Sudeste, 5,8% do Nordeste, 5,3% do Centro-Oeste e 3,5% do Sul do país; não havendo amostras de indivíduos da região Norte (VIANNA et al., 1986).

O estudo da freqüência de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* foi realizado em amostras de soro de indivíduos da população rural do município de Cássia dos Coqueiros, estado de São Paulo; o teste ELISA foi utilizado na detecção dos anticorpos, os resultados inconclusivos foram confirmados através do WB e os autores demonstraram a prevalência sorológica de 2,1% na população analisada (BRAGAZZA et al., 2002).

A soroprevalência de cisticercose humana na região do Triângulo Mineiro foi demonstrada, utilizando-se os testes RIFI e ELISA, em amostras de soros de 1133 doadores de sangue e apresentou 5,5% de freqüência de positividade nos testes, sendo 4,7% em amostras de indivíduos provenientes de Uberlândia, Minas Gerais (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002).

A análise da reatividade de anticorpos IgG presentes em amostras pareadas de LCR e soro de pacientes com as formas ativa e inativa de NC foi realizada por ELISA cujos resultados demonstraram que a detecção de anticorpos específicos em ambas amostras foram equivalentes sugerindo-se que as amostras de soro podem ser utilizadas em casos de contra-indicação da punção lombar em pacientes com NC ativa (BARCELOS et al., 2005).

Os testes ELISA e WB foram utilizados na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro de indivíduos com NC, de pacientes com outras parasitoses e de

indivíduos saudáveis provenientes do Triângulo Mineiro, Minas Gerais demonstrando os peptídeos que foram reconhecidos nos extratos salino total e líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium*. Os autores estabeleceram o critério diagnóstico de NC em amostras de soro a partir do reconhecimento de duas ou mais das proteínas imunodominantes com pesos moleculares de 24, 39-42, 47-52, 56, 64-68 e 126-155 kDa (SHIGUEKAWA et al., 2000).

O perfil de peptídeos antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgG presentes em amostras de LCR de pacientes com NC, frente aos extratos salino total e dodecil sulfato de sódio, tanto de metacestódeos de *T. solium* e contra antígenos heterólogos obtidos de *Taenia crassiceps*, foram demonstrados por Barcelos et al. (2001). Nesse estudo, freqüências de reatividade de anticorpos IgG específicos foram elevadas frente aos quatro extratos antigênicos analisados por ELISA.

Os testes RIFI e ELISA foram utilizados na detecção de anticorpos IgG específicos contra o parasito *T. solium* em amostras de soros de indivíduos provenientes da população do município de Catalão, estado de Goiás. Nessa pesquisa, o teste WB foi utilizado como método confirmatório para cisticercose através do reconhecimento de peptídeos imunodominantes do extrato salino, descritos por Shiguekawa et al. (2000); a soroprevalência confirmada foi de 11,3% na população analisada (OLIVEIRA et al., 2006).

A divergência genética intra-específica em *T. solium* correlaciona-se, provavelmente, com a variação clínica apresentada por pacientes com cisticercose. Na América Latina os pacientes apresentam, predominantemente, a NC. Na Ásia, a forma mais comum de cisticercose se constitui na de localização subcutânea e, na África, é mais complexa a apresentação da doença pois há áreas onde predomina NC e a subcutânea é

rara e outras localidades onde ambas as formas clínicas ocorrem igualmente (CAMPBELL et al., 2006).

Estudos sobre a biologia e a genética de *T. solium* auxiliarão no entendimento da heterogeneidade clínica e imunológica apresentada pelos pacientes com NC. No México, recentemente, alguns laboratórios da Universidade Nacional Autônoma se uniram e implantaram o Projeto Genoma de *T. solium*, com o objetivo de determinar parâmetros básicos do genoma desse helminto, tais como o tamanho do genoma, o cariótipo, a densidade de genes e a diversidade de seqüências repetidas no DNA; na segunda fase do projeto está prevista a avaliação dos resultados para a elaboração de estratégias de controle e prevenção da infecção de humanos e suínos, por esse parasito (AGUILAR-DIAZ et al., 2006).

O Brasil possui uma área territorial de 8.547.403,5 km^2, com grande diversidade geográfica e climática, que aliadas aos fatores inerentes aos hospedeiros (culturais, genéticos e sócio-econômicos) podem influenciar no aparecimento de polimorfismo no DNA de parasitos. A análise de polimorfismo em amostras de metacestódeos de *T. solium*, provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil, e a distinção no padrão de resposta imunológica dos hospedeiros frente aos extratos antigênicos obtidos dessas populações do parasito, contribuirão para a compreensão da associação entre parasito-hospedeiro e da heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes com NC. Pesquisas sobre a genética do parasito auxiliarão no diagnóstico sorológico da NC humana.

2. OBJETIVOS

Os metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas brasileiras foram investigados nesse estudo para:

- Verificar o polimorfismo no DNA desses metacestódeos por meio de marcadores RAPD;

- Comparar a freqüência de reatividade de anticorpos IgG específicos detectados em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose e controle, frente aos extratos salinos totais;

- Comparar os marcadores antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgG específicos em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose e controle, frente aos extratos salinos totais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, processo número 113/2002.

3.2. Obtenção dos metacestódeos de *T. solium*

Os metacestódeos de *T. solium* provenientes de cada área geográfica foram dissecados de músculos esqueléticos de suínos, naturalmente infectados, conforme Costa et al. (1982). Foram lavados em solução salina (NaCl 0,15M) por quatro vezes, identificados e armazenados -20ºC, exceto os metacestódeos de Uberaba-MG, que foram dissecados de cérebro humano, durante autópsia, e armazenados em formol a 40%. Cinco amostras de metacestódeos foram obtidas de áreas geográficas distintas do Brasil, sendo 1) Distrito Federal (DF), região Centro-Oeste; 2) Barreiras (Bahia), região nordeste e as amostras provenientes da região Sudeste: 3) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito que abrange quatro municípios mineiros: Águas Vermelhas, Curral de Dentro, Divisa Alegre e Santa Cruz de Salinas, (norte de Minas Gerais); 4) São Paulo (SP), e 5) Uberaba, Triângulo Mineiro, Minas Gerais.

3.3. Biologia Molecular

3.3.1. Extração de DNA Genômico

A extração de DNA foi realizada segundo Casas et al. (1995), modificado por Gonzalez et al. (2002), utilizando um único metacestódeo (10 mg) removido de suíno sacrificado ou 10 mg de músculo de suíno não infectado por *T. solium*

(Controle). A amostra foi colocada em um tubo de microcentrífuga esterilizado, macerada na presença de nitrogênio líquido, com auxílio de uma haste de PVC esterilizada. A seguir as amostras foram lisadas com 50 µL do tampão contendo 4M de tiocianato de guanidina (Sigma, USA), 25 mM de citrato de sódio (p H7,0) (Sigma), 1mM de DTT (Dithiothreitol – Sigma) e 0,5% de sarcosil (Sigma) durante 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 4000 x g (Brinkmann, USA) durante cinco minutos, procedeu-se à colheita do sobrenadante e desprezou-se o sedimento. A seguir, o DNA foi precipitado com 50 µL de isopropanol (Dinâmica, Brasil) durante duas horas a -20°C. Submeteu-se o material obtido a 11750 x g durante 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol a 70% (Dinâmica) ao sedimento. Novamente a mistura foi submetida a 11750 x g durante 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi desidratado à temperatura ambiente e posteriormente, dissolvido em 30 µL de água bi-destilada estéril. As amostras de DNA foram diluídas 1:100 em água bi-destilada esterilizada, sendo posteriormente, identificadas e armazenadas a –20°C.

3.3.2. Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (GBC-UV/VIS911A, USA), a 260 nanômetros. O cálculo da concentração de DNA foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$|DNA| = ABS\ (260nm) \times fc \times fd$$

Onde:

|DNA| : concentração de DNA em nanogramas/microlitros

ABS (260 nm): leitura da absorbância do DNA a 260 nanômetros

fc: fator de conversão da cubeta = 50 (cubeta de quartzo)

fd: fator de diluição da amostra = 100 (10 microlitros de amostra em 990 microlitros de água bi-destilada).

3.3.3. Amplificação do DNA de metacestódeos de *T. solium* utilizando a "Random Amplified Polymorphic DNA"

A RAPD foi otimizada obedecendo as seguintes concentrações dos reagentes: 400 µM de dNTPs (Amersham Biosciences, USA), 3 mM de $MgCl_2$ (Lab Trade, Brasil), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Lab Trade), tampão da Taq DNA polimerase 1X (Lab Trade), 1 nmol de "primer", 30 nanogramas de DNA da amostra do parasito e água bi-destilada estéril para um volume final de 25 µL.

A reação de RAPD foi caracterizada por uma desnaturação inicial a 94°C/5min seguida de três etapas de 35 ciclos: desnaturação a 94°C/30 seg., anelamento a 36°C/1min e extensão a 72°C/2min e extensão final a 72°C por dez minutos em termociclador Gene Amp® (Perkin Elmer, New Jersey, USA). A temperatura foi reduzida a 4°C, a reação foi retirada do termociclador e aplicada em gel de agarose 2% (Acros Organics, Bélgica) para a observação dos produtos amplificados.

Foram testados 35 "primers" decâmeros (Gene Link, USA) para cada amostra de DNA do parasito, provenientes das cinco áreas geográficas brasileiras amostradas.

3.3.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose (Acros Organics) a 2%, submetido a corrida eletroforética a 125 V em tampão TBE 1X (0,23 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA pH 8,0 e 0,23 M ácido bórico) (Pharmacia, Suécia), a separação foi acompanhada por marcador de DNA de 100 pares de bases (pb) (Promega,

USA). O tempo de corrida foi de 90 minutos. Após este tempo, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (Sigma) (5 μg/ml), visualizado em transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia) e fotografado em filme Polaroid 667, preto e branco (Sigma).

3.4. Amostras de soro, preparação do extrato salino e ensaios Imunológicos

3.4.1. As Amostras de Soro

Foram colhidas amostras de sangue de 157 indivíduos, cujos soros foram obtidos após centrifugação a 350 x g (Fanem, Brasil), durante 5 minutos e temperatura ambiente. Os indivíduos foram agrupados em:

Grupo 1 - 49 pacientes com diagnóstico comprovado de NC através de síndrome clínica (cefaléia, meningite, epilepsia, mielopatias, hemiparesias, distúrbios de comportamento ou vertigem), dados epidemiológicos, tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância magnética (RM). Sendo que dezenove pacientes apresentaram a forma ativa da NC e trinta a forma inativa.

Grupo 2 – 68 indivíduos com outras parasitoses, sendo: 10 infectados com hidatidose (*Echinoccocus granulosus*), 20 com estrongiloidíase (*Strongyloides stercoralis*), 20 com teníase (*Taenia* sp), 10 com esquistossomose (*Schistosoma mansoni*) e oito com *Hymenolepis nana*. As amostras séricas dos indivíduos com hidatidose foram colhidas após a confirmação do diagnóstico por ultrassonografia e/ou cirúrgia que evidenciaram a presença de hidatidose cística. As demais amostras foram colhidas de indivíduos com exames de fezes positivo após a análise de três amostras pelos métodos de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS E JANER, 1934) e/ou Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) para as parasitoses citadas. As análises foram

executadas por técnicos do Laboratório de Parasitologia da UFU ou do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU).

As amostras de soro, do Grupo 1 foram obtidas de pacientes atendidos no HC-UFU nas unidades ambulatoriais, enfermarias ou no serviço de pronto socorro. E as do grupo 2 foram obtidas de pacientes do HC-UFU ou por doação de outras Instituições de Ensino Superior e da equipe de trabalho do Laboratório de Parasitologia da UFU. As amostras de indivíduos com hidatidose foram doadas pela Dra Fátima Maria Tiecher da Seção de Parasitologia do Laboratório Central do Rio Grande do Sul - RS.

Grupo 3 (Controle) – constituído de 40 indivíduos saudáveis, com exames de fezes (três amostras) negativos para parasitos intestinais e sem história de teníase. Esses indivíduos doaram amostras de sangue ao Laboratório de Parasitologia da UFU.

Todas as amostras foram estocadas à - 20°C.

3.4.2. Preparo do Extrato Salino Total de metacestódeos de *T. solium*

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. solium*, procedentes do DF, BA, RM-MG e SP para o preparo de extrato salino total da área. Na amostra de UB-MG, o procedimento não foi realizado porque os metacestódeos dessa área estavam conservados em formol a 40%. O processo, segundo Costa et al. (1982), foi realizado lavando-se os cisticercos obtidos após o rompimento deles em 5 mL de água destilada. A seguir esta preparação foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas-Col) a 4°C (banho de gelo) por 5 minutos e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Inpec Eletrônica, Brasil) a 40 khz por quatro períodos de 30 segundos em banho de gelo. Após isotonização com 5 mL de solução de NaCl 0,3 M, empregou-se mais três períodos de ultra-som. A mistura foi submetida a 4°C por duas horas sob agitação lenta. Após centrifugação a 12.400 x g (Du

Pont SORVALL Products Newtown, Connecticut, USA) por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante constituiu o extrato salino total.

Os extratos salinos obtidos foram divididos em volumes de 200 µL, identificados e conservados a −20°C até o momento do uso.

3.4.3. Dosagem de Proteínas

As dosagens protéicas dos extratos salinos obtidos foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma).

3.4.4. Teste Imunoenzimático ELISA para Detecção de Anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em Amostras de Soro

Os testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em todas as 157 amostras de soro, foram realizados conforme Costa (1986) com modificações. Placas de poliestireno (Corning, USA) foram utilizadas como suporte para a adsorção dos extratos salinos totais. Inicialmente, foram realizados pré-testes de otimização da reação, em que a concentração dos extratos antigênicos foi ensaiada em 10 e 5 µg/mL e o conjugado IgG marcado com peroxidase foi testado em diferentes títulos: 1000, 2000 e 4000 e posteriormente confirmado no título 3000. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas, em câmara úmida, com 50 µL de solução dos diferentes antígenos, na concentração ideal de 5 µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato (Cinética Química, Brasil) (0,06 M, pH 9,6). Após este período e três lavagens de 5 minutos em PBS adicionado de Tween 20 a 0,05% (Biotec, Brasil) (PBS-T), foram colocados 50µL de amostras de soro diluídos em PBS-T a 1:200 e incubados por 45 minutos a 37°C, em câmara úmida. Em todas as placas foram incluídos controles da reação

que consistiram de uma amostra de soro padrão positivo e três amostras padrão negativos. Após três lavagens das placas em PBS-T colocou-se 50 µL do conjugado IgG (Sigma, cadeia γ específica) de cabra anti-IgG humana-peroxidase, no título ideal de 3000 em PBS-T. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, em câmara úmida.

Após três lavagens a reação foi revelada utilizando como substrato 50µL da solução de 5 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) (Sigma) + 12,5 mL de tampão citrato fosfato (Merck, Germany) (pH 5,0) + 5µL de H_2O_2 30% (Merck). Após 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25µL de solução 2N de H_2SO_4 (Vetec, Brasil) e os valores de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de microplacas de ELISA (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, USA). O limiar de reatividade "cut off" foi calculado pela média aritmética da densidade óptica (DO) das três amostras de soro padrão negativos, acrescidas de 2 desvios padrão (BASSI et al., 1991) e o índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo-se a DO de cada amostra pelo "cut off" da reação. Considerou-se positiva a amostra com IR>1 (PARDINI et al., 2002).

3.4.5. Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Teste "Western Blotting" para Detecção de Anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em Amostras de Soro

Os extratos salinos totais (200 µg/gel) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% segundo Laemmli (1970). O gel foi preparado entre placas de vidro medindo 10 x 8 cm que foram montadas empregando-se espaçadores de teflon de 1mm de espessura e suporte apropriado para vedação (Bio-Rad, USA).

Para a preparação do gel de separação, utilizou-se: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 (Sardi, Brasil); SDS 0,1 % (Pharmacia); ácido etileno-diamino-tetra-ácetico 2 mM

(EDTA) (Gibco-Brl, USA); acrilamida a 29% (Pharmacia); bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida) a 1% (Sigma); água bidestilada; N,N,N,N-tetrametil-aminometano a 0,125 % (TEMED) (Sigma) e persulfato de amônio a 0,125 % (APS) (Vetec, Brasil). A mistura foi colocada lentamente nas placas montadas, tomando-se cuidado para evitar a formação de bolhas no interior do gel. Para evitar a polimerização do gel em presença de oxigênio, foi colocada uma camada de 50µL de butanol ($C_4H_{10}O$) (Vetec), descartada posteriormente, após a polimerização do gel de separação.

Em seguida, foi realizada a preparação do gel de empilhamento com Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1% ; EDTA 2 mM; acrilamida-bis-acrilamida 5%; água bidestilada; TEMED 0,125% e APS a 0,125%. O gel de empilhamento foi depositado na placa sobre o gel de separação e colocou-se o pente (molde de teflon) para a formação dos poços de aplicação, aguardando-se 10 minutos para a polimerização.

Nas placas contendo o gel a 12% foram aplicados, após fervura em banho-maria a 100°C durante três minutos, 20 µL de cada extrato antigênico obtido, diluído v/v em tampão de amostra, na concentração de 10 µg de proteínas para o procedimento de coloração do gel por nitrato de prata (Merck) e por "Coomassie Brilliant Blue" (Bio-Rad) ou na concentração de 200 µg de proteínas para a posterior transferência dos peptídeos para membrana de nitrocelulose (Osmonics, EUA), poros de 0,45 micron de diâmetro. No mesmo gel foram aplicados os padrões de peso molecular, no volume de 5 µL, fervidos previamente. Foram utilizados os padrões de pesos moleculares contendo as proteínas: Miosina (205 kDa); β-Galactosidase (116 kDa); Fosforilase b (97 kDa); Frutose-6-fosfato quinase (84 kDa); Soroalbumina bovina (66 kDa); Desidrogenase glutâmica (55 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (36 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa); Tripsinogênio (24 kDa); Inibidor de tripsina (20 kDa); α-

Lactalbumina (14 kDa); Aprotinina (6 kDa) (Sigma). A corrida eletroforética foi processada em corrente constante de 25 mA, por 90 minutos.

A transferência das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo Towbin, Staehelin e Gordon (1979) com modificações. Foi preparado um "sandwich" utilizando-se 6 folhas de papel de filtro, uma membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas e 6 folhas de papel de filtro por cima. A transferência foi efetuada em sistema semi-úmido, utilizando-se o Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia). As folhas de papel de filtro, a membrana de nitrocelulose e o gel foram umedecidos em tampão de transferência. A corrente elétrica aplicada foi de 0,8 mA por cm^2, constante durante duas horas. Após a transferência, a nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S (Merck) a 0,5 % em ácido acético a 1 % para a confirmação da eficiência da transferência.

As membranas de nitrocelulose, contendo as frações protéicas, foram cortadas em tiras de, aproximadamente, três milímetros de largura.

O perfil de peptídeos dos metacestódeos reconhecidos pelos anticorpos presentes nas amostras de soro de 98 do total de 157 pacientes amostrados foi analisado pela técnica de WB. Dentre as amostras analisadas foram incluídas as amostras de soro dos quarenta e nove pacientes com NC do Grupo 1, 39 amostras do Grupo 2, sendo dez pacientes com hidatidose, sete com teníase, dez com estrongiloidíase, oito com esquistossomose mansônica e quatro com himenolepíase e do Grupo 3 foram analisadas 10 amostras.

A reação de WB foi iniciada após a identificação das tiras e a lavagem das mesmas com água destilada para eliminar a solução de Ponceau S (Sigma). A primeira etapa da reação consistiu em bloquear os sítios ativos com 1000 µL da solução de PBS-T adicionada de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) durante duas horas, à

temperatura ambiente e sob agitação lenta. Após este período, desprezou-se a solução de bloqueio e adicionou-se 500 µL das amostras de soro, diluídas 1:50 em PBS-T com 1% de leite desnatado (PBS-T-M 1%) na tira correspondente e as amostras padrão, positiva e negativa de soro e controle (só diluente) também foram adicionadas e as tiras foram incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação lenta e contínua em câmara úmida. Posteriormente, realizou-se seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-T-M 1%. Após as lavagens, foram adicionados 500 µL do conjugado IgG de coelho anti-imunoglobulina G humana marcado com peroxidase (molécula total, Sigma), diluído a 1:200 em PBS-T-M 1%. A reação foi incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação lenta e contínua. As tiras foram submetidas a seis lavagens de cinco minutos cada em PBS (pH 7,2) e a reação foi revelada com 500 µL da solução contendo 10 mg de 3,3-diaminobenzidina (DAB) - (Sigma) diluídos em 10 mL de PBS e 1000 µL de solução a 30% de H_2O_2 (Merck).

Após o aparecimento de bandas de coloração marrom, ocorrida em cerca de cinco minutos, a reação foi interrompida pela adição de água destilada nas canaletas contendo as tiras de nitrocelulose e lavadas por mais duas vezes seguidas. As tiras foram envolvidas por folhas de papel e colocadas sobre a bancada para secagem a temperatura ambiente.

Posteriormente, foram realizados os cálculos do peso molecular aparente de cada fração antigênica reconhecida pelos anticorpos presentes nas amostras de soro testadas. O critério de positividade no WB descrito por Shiguekawa et al. (2000) em que o reconhecimento de duas das seguintes bandas: 24, 39-42, 47-52, 56, 64-68 e 126-155 kDa, confirma o diagnóstico sorológico da cisticercose.

3.5. Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizada de acordo com as normas de biossegurança segundo Chaves-Borges, Mineo (1997).

3.6. Análise Estatística

Para análise dos fragmentos de DNA das amostras de metacestódeos de *T. solium* obtidos através do teste RAPD foi utilizado o programa STAT 4.5 e o polimorfismo entre os parasitos pela análise UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithimetic Average – Método de Pareamento de Grupos usando Média Aritmética Não Ponderada).

O peso molecular dos peptídeos foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores em relação ao Rf (motilidade relativa), utilizando o "Software Graph Pad Prism versão 3.0" (Graph Pad Software, Inc.). O Rf de cada peso molecular foi calculados a partir da fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distância da origem à migração (em centímetros)}}{\text{Distância da origem até o ponto de referência (em centímetros)}}$$

As análises estatísticas dos resultados do testes ELISA e WB foram realizadas utilizando-se o programa de computação "Software Graph Pad Prism versão 3.0" (Graph Pad Software, Inc.) para confecção de gráficos e o "Software BioEstat versão 2.0" (AYRES et al., 2000) para comparação entre as freqüências de reconhecimento de anticorpos por meio do teste da diferença entre duas proporções com erro máximo de 5% ($p < 0,05$). A hipótese nula foi aceita para $p \geq 0,05$ (5%).

4. Resultados

4.1. Amostras do parasito

A Figura 2 apresenta a distribuição geográfica das cinco (DF, BA, RM-MG, SP e UB-MG) amostras de metacestódeos de *T. solium* analisadas nesse estudo.

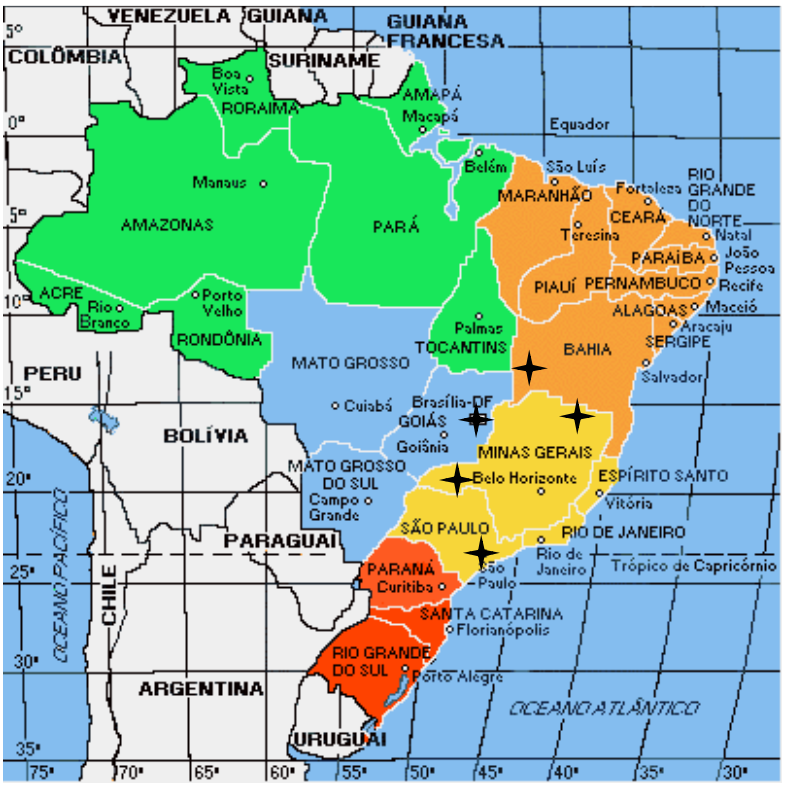

Figura 2 – Localização geográfica brasileira das populações de metacestódeos de *T. solium* amostradas (✦).

4.2. Extração do DNA Genômico

A extração de DNA genômico de metacestódeos de *T. solium* foi realizada e quantificada utilizando amostras de diferentes áreas geográficas do Brasil, conforme demonstrado na Tabela 1. A dosagem média de DNA genômico a partir de um único metacestódeo foi de 241 ng/µL. O menor valor obtido foi na extração de DNA do metacestódeo de UB-MG.

Tabela 1 – Quantificação do DNA genômico de metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil, densidade óptica a 260nm.

Área Geográfica do Brasil	**Armazenamento**	**Hospedeiro**	**DNA (ng/µL)***
Brasília (DF)	Liofilizada, -20°C	Suíno	287
Barreiras (BA)	Salina, -20°C	Suíno	225
Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito (RM-MG)	Salina, -20°C	Suíno	270
São Paulo (SP)	Liofilizada, -20°C	Suíno	375
Uberaba (UB-MG)	Formol 40%, TA	Humano	50

*(ng/µL): nanogramas/ microlitros; TA: Temperatura Ambiente.

4.3. Fragmentos de DNA de metacestódeos de *T. solium* amplificados pela RAPD

Foram analisados 35 “primers”, decâmeros diferentes na amplificação do DNA genômico de *T. solium*. As seqüências de bases nitrogenadas dos “primers” e as amostras que geraram amplificação de fragmentos de DNA em 17 dos 35 “primers” analisados nesse estudo estão relacionadas na Tabela 2. Os fragmentos amplificados na RAPD estão demonstrados na Figura 3.

Foram considerados fragmentos polimórficos aqueles de tamanho em pares de bases (pb) diferentes gerados em pelo menos um par de populações dos metacestódeos analisados. Os fragmentos polimórficos obtidos com seis “primers” (3, 17, 26, 29, 33 e 35) apresentaram tamanhos entre 103 a 1434 pb nas cinco amostras de metacestódeos de *T. solium* (Figura 3). Em média cada “primer” gerou 2,7 bandas provenientes de um único parasito. O “primer” 3 gerou os fragmentos de 800 e 434 pb na amostra do DF e na amostra BA de 103, 244 e 326 pb. O “primer” 17 gerou fragmentos polimórficos de 1000 e de 244 pb na amostra do DF e de 200 e 137 pb na BA. O “primer” 26 gerou os fragmentos de 1000, 500 e 326 pb na amostra de UB-MG e os fragmentos de 600 e 244 pb na amostra de RM-MG. O “primer” 29 gerou fragmentos polimórficos em quatro das amostras analisadas, sendo que na amostra de SP os fragmentos apresentados tiveram tamanho de 500, 800 e 1191 pb, na amostra de UB-MG foram de 300 e 1377 pb, na amostra do DF o fragmento polimórfico de 1000 pb e na amostra da BA gerou-se os fragmentos de 244 e 434 pb. O “primer” 33 gerou os fragmentos de 800, 600, 400 e 326 pb no DNA de metacestódeo proveniente do DF e na BA foram amplificados somente os fragmentos de 400 e de 326 pb (Tabela 3). O “primer” 35 gerou um único fragmento na amostra do DF de 1434 pb e o fragmento de 800 pb na amostra da BA.

O controle da reação, DNA de suíno, sofreu amplificação pelos “primers” 3 e 29, no primeiro apresentou fragmentos de 800, 500, 400, 326, 300, 244 e 100

Tabela 2 – "Primers" utilizados no teste RAPD para a amplificação do DNA de metacestódeos de *Taenia solium* e a eficiência na amplificação.

Código*	Seqüência de nucleotídeos	Amplificação	Origem geográfica da amostra amplificada**
01	CAGGCCCTTC	-	-
02	TGCCGAGCTG	+	BA
03	AGTCAGCCAC	++	DF/BA
04	AATCGGGCTG	-	-
05	AGGGGTCTTG	-	-
06	GGTCCCTGAC	-	-
07	GAAACGGGTG	-	-
08	GTGACGTAGG	-	-
09	ACGGATCCTG	-	-
10	GAGGATCCCT	-	-
11	CCTGATCACC	++	BA
12	GGTGATCAGG	-	-
13	CCGAATTCCC	++	RM-MG
14	GGGAATTCGG	-	-
15	CCGATATCCC	+	BA
16	GGGATATCGG	-	-
17	GGATGAGACC	++	DF/BA
18	ACTGGGACTC	-	-
19	AGCGTCCTCC	-	-
20	ACGACCGACA	+	DF
21	GGCTCATGTG	++	RM-MG
22	GGGCCACTCA	-	-
23	GGAGAGACTC	+	BA
24	TCCACTCCTG	+	BA
25	CACAGAGGGA	++	RM-MG
26	GGGTTTGGCA	++	RM-MG/UB-MG
27	CCCTAGACTG	-	-
28	GGAGCCTCAG	-	-
29	TCGCCAGCCA	++	DF/BA/SP/UB-MG
30	ACGGGAGCAA	+	DF
31	AGCAGCGCAC	+	BA
32	CAAACGTGGG	-	-
33	AGACGATGGG	+	DF/BA
34	AAGCCTGCGA	-	-
35	GGGTCTCGGT	+	DF/BA

*número da relação dos 35 "primers" testados; (-): nenhuma amplificação, (+): amplificação de até três bandas, (++): amplificação de quatro ou mais bandas. **: área geográfica conforme a Tabela 1.

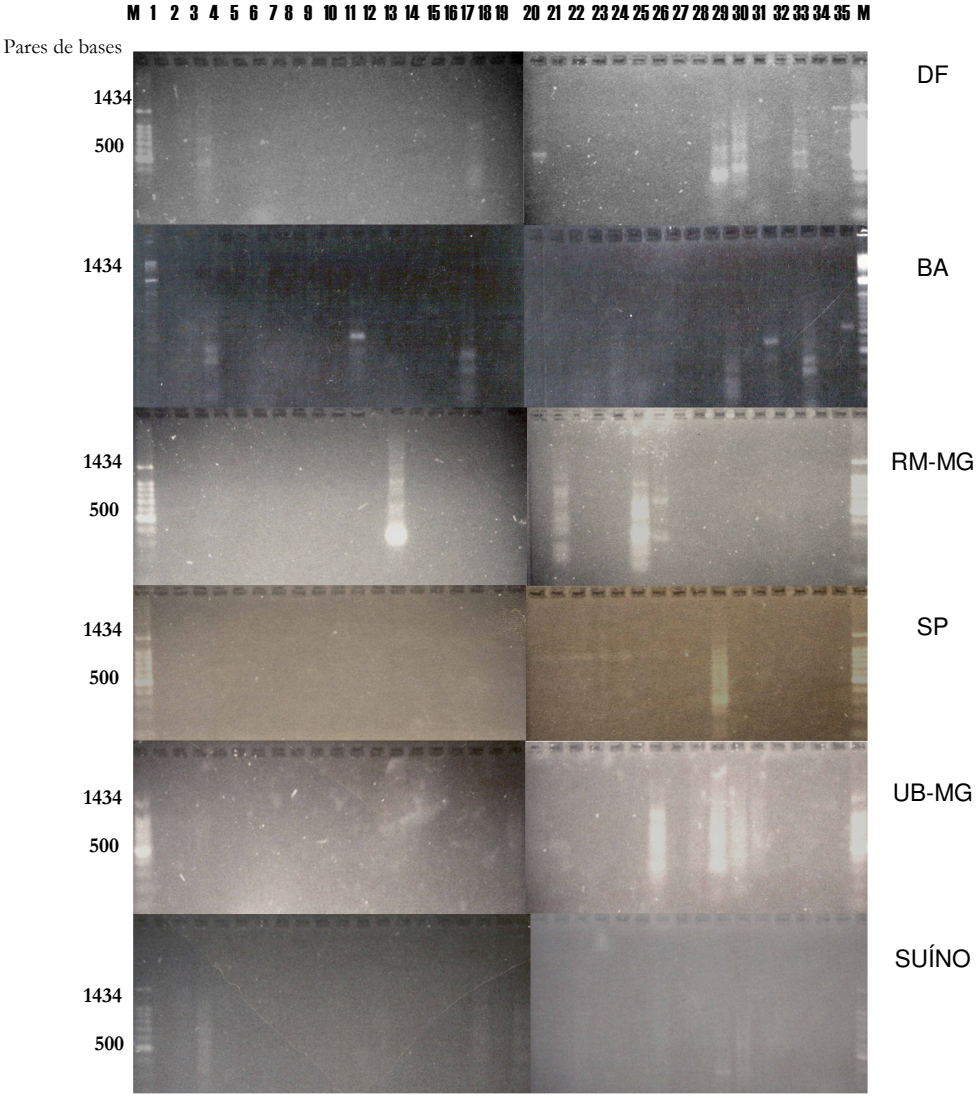

Figura 3 – Produtos da RAPD amplificados de metacestódeos de *Taenia solium* provenientes das áreas geográficas: (DF) Distrito Federal, (BA)Barreiras-BA, (RM-MG) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito-MG, (SP) São Paulo-SP e (UB-MG) Uberaba-MG. F) DNA de suíno. As linhas: 1 a 35 referem-se aos "primers" em gel de agarose 2% . M: marcador de 100 pares de bases.

pb e no segundo, somente o fragmento de 100pb, portanto, com padrão de amplificação diferente em relação às amostras de metacestódeos de *T. solium.*

O dendograma demonstrando os valores obtidos na análise de distância genética entre as populações de metacestódeos de *T. solium* está apresentado na Figura 4. As amostras analisadas pela RAPD geraram em seis "primers", 15 marcadores. A amostra do DF apresentou a maior distância genética em relação as demais (49,5%), seguida pela amostra da BA (48%) e UB-MG (38,5%). As amostras de SP e RM-MG (28%) apresentaram menor variabilidade genética entre si.

Tabela 3 - Fragmentos polimórficos gerados por RAPD em metacestódeos de *Taenia solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil. Distrito Federal (DF), Bahia (BA), Rio Mosquito (RM-MG), Uberaba (UB-MG) e São Paulo (SP).

"primer" n (seqüência 5'-3'	**Fragmentos (pb) gerado**	**População de metacestódeo**
3 (AGTCAGCCAC)	800 e 434	DF
	103, 244 e 326	BA
17 (GGATGAGACC)	1000 e 244	DF
	200 e 137	BA
26 (GGGTTTGGCA)	600 e 244	RM-MG
	1000, 500 e 326	UB-MG
29 (TCGCCAGCCA)	1000	DF
	244 e 434	BA
	300 e 1377	UB-MG
	500, 800 e 1191	SP
33 (AGACGATGGG)	800, 600, 400 e 326	DF
	400 e 326	BA
35 (GGGTCTCGGT)	1434	DF
	800	BA

n: número do "primer"; pb: pares de bases.

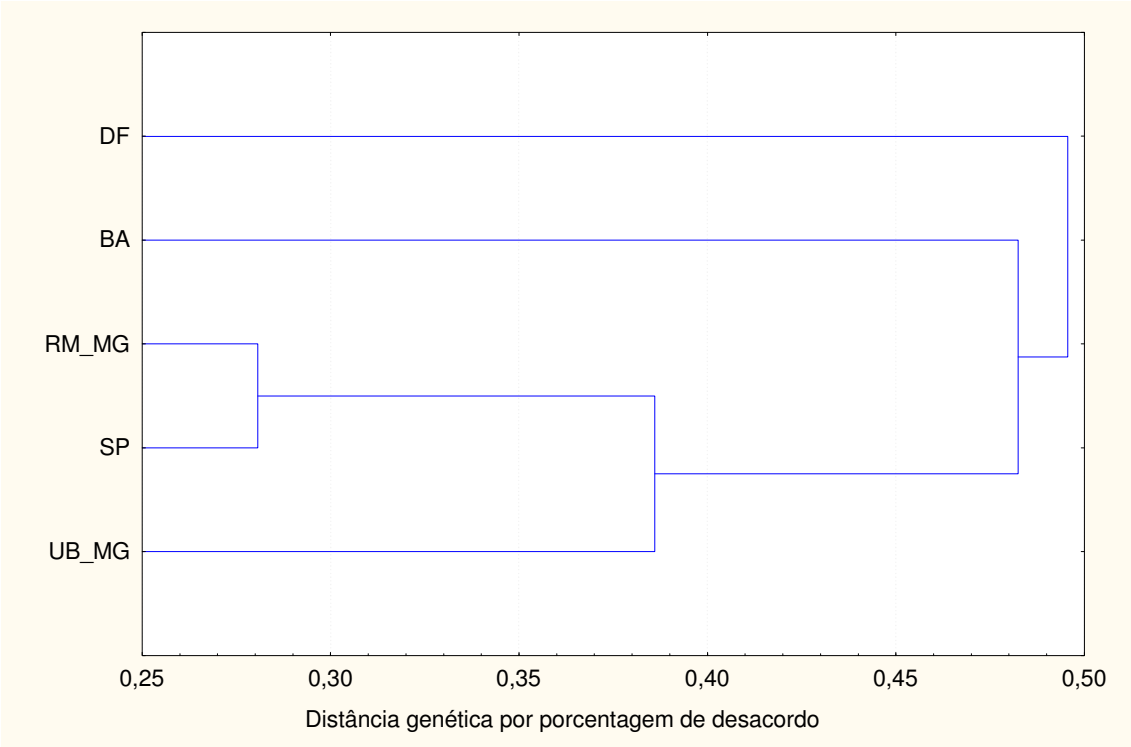

Figura 4 - Distância genética baseada na porcentagem de desacordo de 15 marcadores RAPD obtidos com seis "primers" agrupados ao acaso pelo método "unweighted pair group method with averages (UPGMA)" para cinco populações de metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil: BA) Bahia; DF) Distrito Federal; RM- MG) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito, Minas Gerais; SP) São Paulo e UB-MG) Uberaba, Minas Gerais.

4.4. Dosagem protéica dos extratos salinos obtidos

As dosagens protéicas dos extratos salinos obtidos estão demonstradas na Tabela 4. Os metacestódeos provenientes de UB-MG não foram utilizados na preparação de extrato antigênico porque o armazenamento em formol inviabilizou sua aplicação nos testes imunológicos. A dosagem protéica média dos extratos salinos preparados foi de 1.215 μg/mL para 50 metacestódeos de *T. solium*.

Tabela 4. Dosagem protéica dos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil.

Localização geográfica dos metacestódeos	**Dosagem Protéica (μg/mL)***
Distrito Federal (DF)	200
Barreiras (BA)	2100
Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito (RM-MG)	1700
São Paulo (SP)	860

*(μg/mL): microgramas/mililitro.

4.5. Caracterização dos pacientes quanto a idade, sexo e procedência geográfica

Na Tabela 5, estão caracterizados os grupos de indivíduos estudados quanto ao sexo e à procedência. No Grupo 1, a idade dos pacientes variou de 14 a 82 anos, com média de 42 anos. No Grupo 2, em 58 pacientes a idade variou de 2 a 71 anos e a média foi de 36 anos, não foi possível obter as idades dos 10 pacientes com hidatidose,. No Grupo 3, a idade dos indivíduos variou de 21 a 80 anos e a idade média foi de 32 anos.

Quanto à origem dos indivíduos, no Grupo 1 nove indivíduos não residiam em Uberlândia – MG, sendo sete provenientes dos municípios mineiros de Indianópolis, Iraí de Minas, Santa Vitória, Araguari, Campina Verde, Logoa Formosa e Ituiutaba; um de Goianésia, Goiás e outro de Porto Velho, Rondônia. No Grupo 2, os indivíduos provenientes de outro município eram de Campina Verde-MG e Araguari-MG (teníase); dois de Araguari-MG e um de Tupaciguara (estrongiloidíase); de Jaíba-MG e outro de origem desconhecida (esquistossomose) e os dez indivíduos com hidatidose eram, procedentes de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os indivíduos do Grupo 3 apresentaram procedência de municípios mineiros (13), de municípios paulistas (5) e do Rio de Janeiro (1).

Tabela 5. Caracterização dos grupos de indivíduos estudados quanto ao sexo e à procedência.

	Grupo	Sexo				Procedência			
		Feminino		Masculino		Uberlândia		Outra	
		N	%	N	%	N	%	N	%
1	Neurocisticercose (n = 49)	30	61,2	19	38,8	40	81,6	9	18,4
2	Outras helmintíases								
	Teníase (n =20)	19	95	1	5	18	90	2	10
	Estrongiloidíase (n = 20)	9	45	11	55	17	85	3	15
	Esquistossomose (n = 10)	4	40	6	60	8	80	2	20
	Hidatidose (n = 10)	4	40	6	60	0	0	10	100
	Himenolepíase (n = 8)	4	50	4	50	10	100	0	0
3	Indivíduos saudáveis (n = 40)	20	50	20	50	21	52,5	19	47,5

4.6. Resultados obtidos no Teste ELISA

A titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana, marcada com peroxidase, foi realizada utilizando-se os títulos de 1000, 2000 e 4000 frente aos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium*, nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil. Na Figura 5 estão demonstradas as curvas obtidas para os diferentes extratos. O título 3000 foi selecionado, pois permitiu discriminar entre as amostras positivas e negativas e a partir desse ponto os valores de DO das amostras de soro padrão, apresentaram declínio acentuado. Não houve diferença entre utilização dos extratos salinos nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, portanto escolheu-se a concentração de 5µg/mL, que permitiu maior economia dos extratos salinos obtidos. Um novo teste para confirmação do título 3000 e da concentração de 5µg/mL dos extratos foi realizado, sendo obtidos resultados satisfatórios, conforme demonstrado na Figura 6.

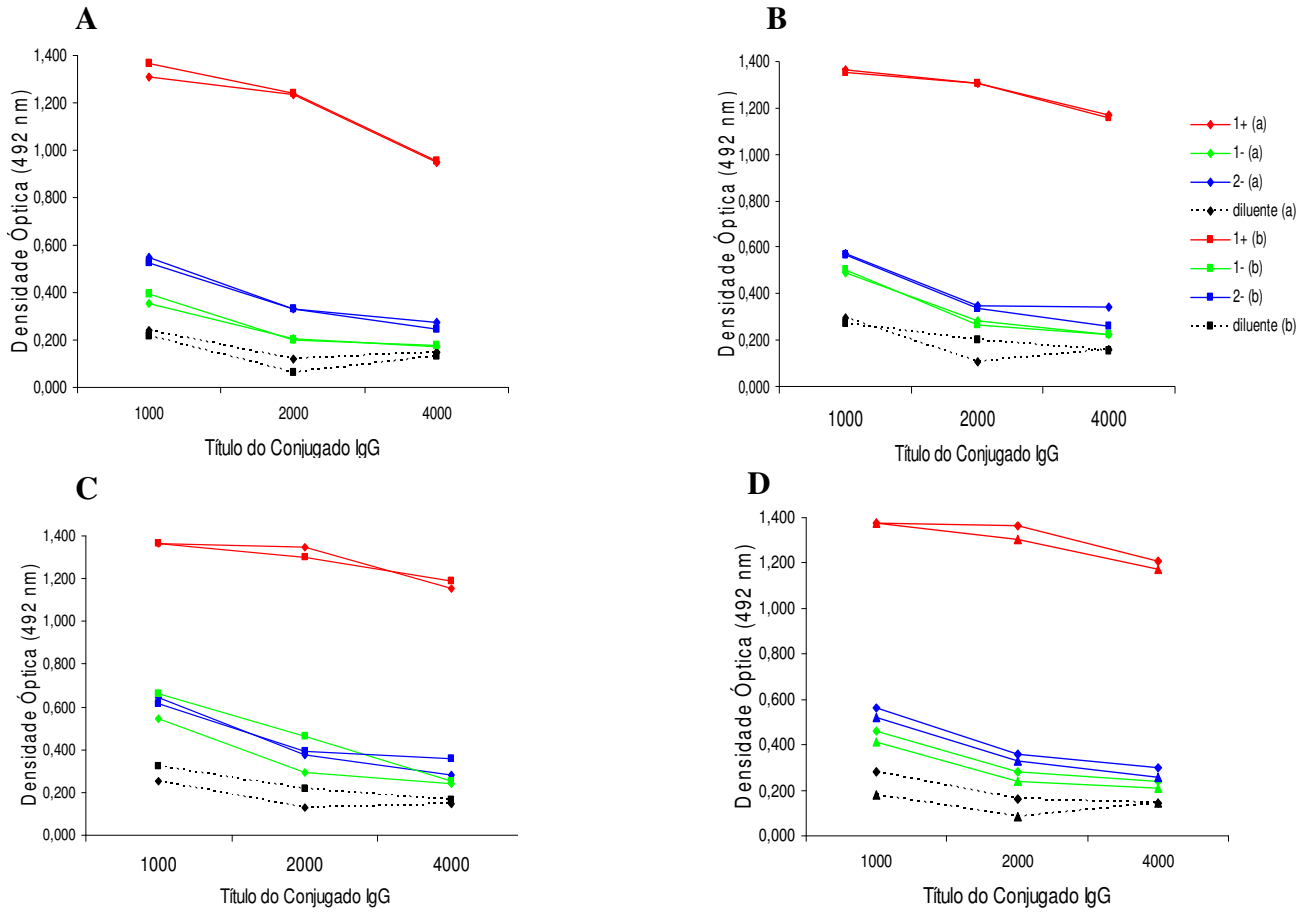

Figura 5. Titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase pelo Teste ELISA frente aos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil: A) Distrito Federal (DF); B) Bahia (BA); C) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito-Minas Gerais (RM-MG) e D) São Paulo (SP). (a): concentração de 5 µg/mL; (b): concentração de 10µg/mL; (+): amostra de soro padrão positivo para cisticercose; (–): amostra de soro padrão negativo para cisticercose; (1): amostra 1 e (2): amostra 2.

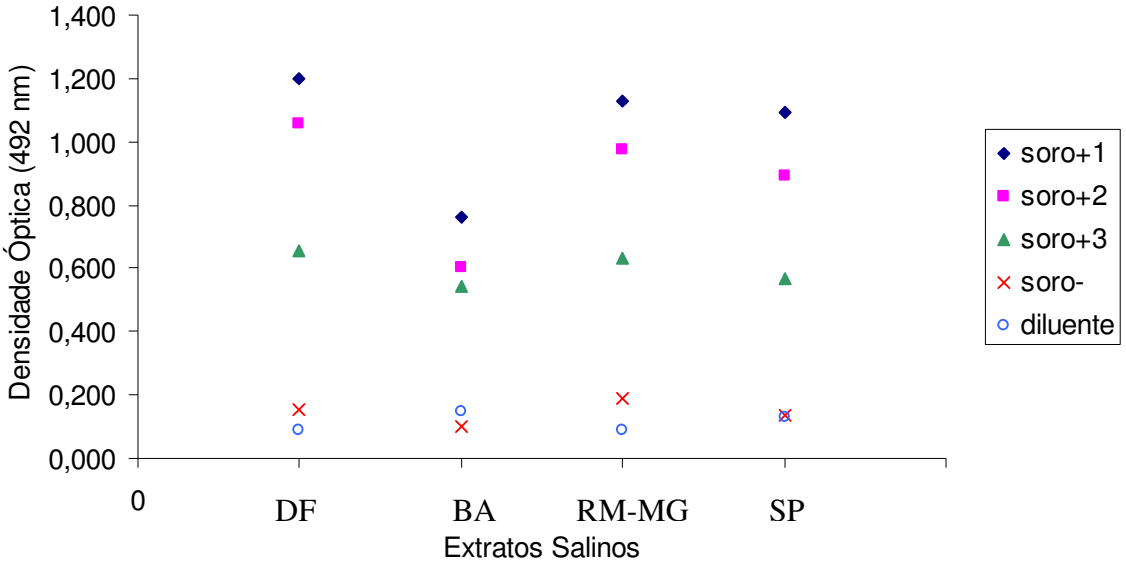

Figura 6. Confirmação do título 3000 do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase pelo ELISA frente aos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium* (5 µg/mL), provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil: do Distrito Federal (DF); da Bahia (BA); Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito-Minas Gerais (RM-MG) e de São Paulo (SP). (+): amostra de soro padrão positivo para cisticercose; (−): amostra de soro padrão negativo para cisticercose. (1); (2); e (3): amostras.

Os resultados da detecção de anticorpos IgG anti- metacestódeos de *T. solium* nas amostras de soro dos indivíduos dos Grupos 1, 2 e 3 frente aos quatro extratos antigênicos analisados por ELISA, expressos em IR, estão apresentados na Figura 7. As amostras de soros de pacientes com NC (a) apresentaram IR mais elevado do que os demais grupos ($p<0,05$), exceto quando comparado com amostras de pacientes com hidatidose. No Grupo 3, constituído de indivíduos saudáveis, as amostras não apresentaram reatividade em nenhum extrato antigênico utilizado.

Na Figura 8 estão demonstradas as freqüências de reatividade pelo ELISA, de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em relação aos antígenos analisados. Houve diferença significante estatisticamente ($p = 0,02$) entre a freqüência de reatividade apresentada pelas amostras testadas do Grupo 1 (NC) no extrato do DF em relação aos demais extratos antigênicos. No Grupo 2, verificou-se elevada freqüência (90% no extrato do DF e 70% nos demais) de reconhecimento dos anticorpos de metacestódeos de *T. solium* nas amostras de soro de pacientes com hidatidose, quando comparada com as demais parasitoses ($p<0,05$). Apenas em uma amostra de soro de pacientes com himenolepíase foram reconhecidos anticorpos, frente ao extrato antigênico proveniente da BA.

A reatividade sorológica nas amostras de soro de pacientes com teníase variou de 5 a 20% nos extratos analisados, enquanto que as amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase e as de pacientes com esquistossomose não apresentaram positividade no extrato salino de metacestódeos provenientes de SP.

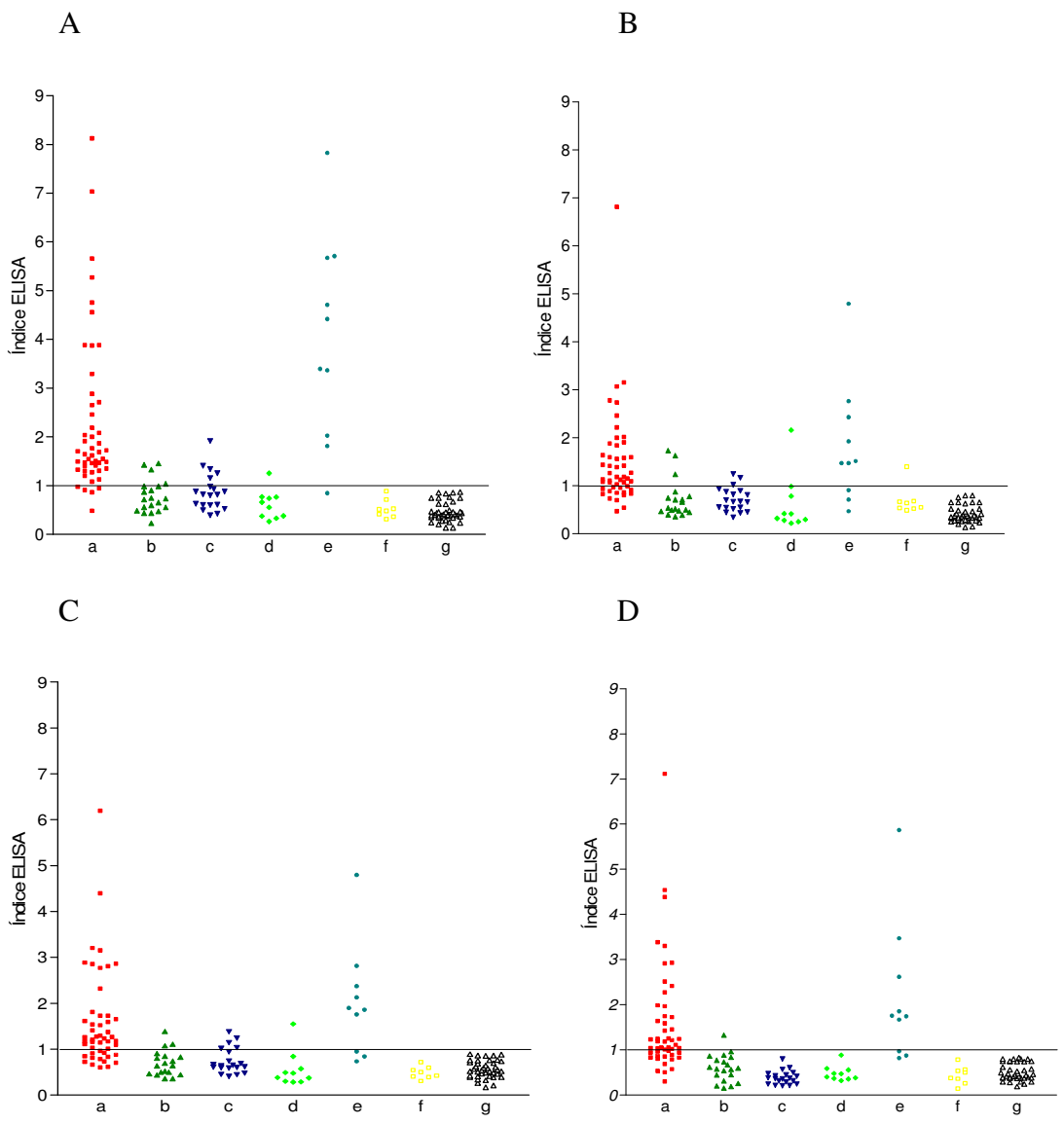

Figura 7. Teste ELISA, expresso em índice ELISA, na detecção de anticorpos IgG, utilizando extratos salinos totais provenientes de metacestódeos de *Taenia solium* de diferentes áreas geográficas do Brasil em amostras de soro diluídas 1:200, sendo: A) Distrito Federal (DF), B) Bahia (BA), C) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito-Minas (RM-MG) e D) São Paulo (SP); grupo 1- a. neurocisticercose (n=49), grupo 2 - b. teníase (n=20), c. estrongiloidíase (n=20), d. esquistossomose (n=10), e. hidatidose (n=10), f. himenolepíase (n=8) e grupo 3 - g. indivíduos saudáveis (n=40).

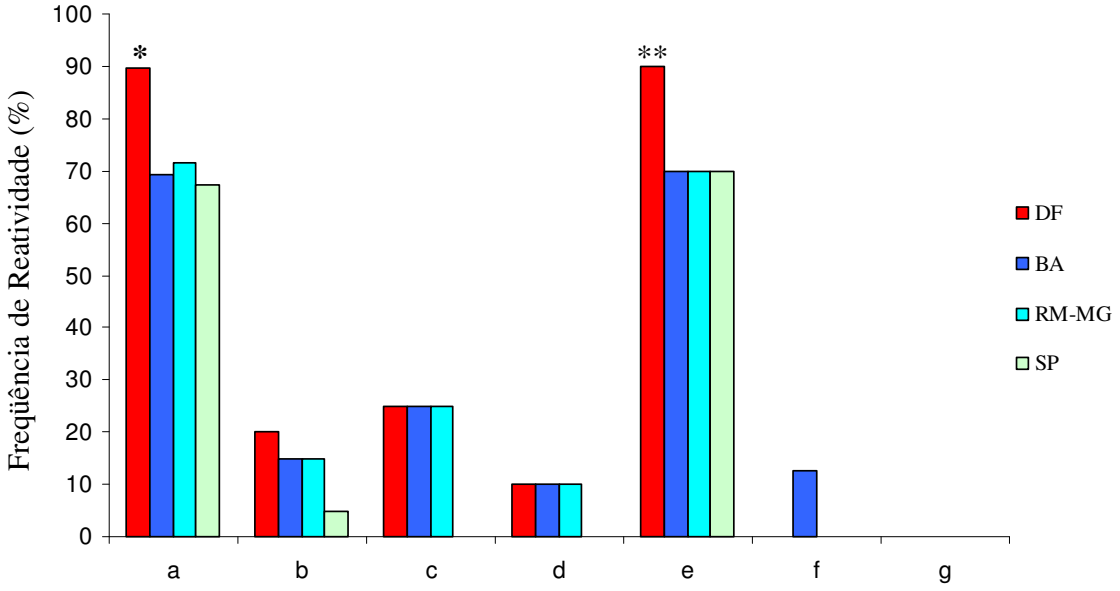

Figura 8 - Freqüência de reatividade no Teste ELISA na detecção de anticorpos IgG utilizando extratos salinos totais provenientes de metacestódeos de *T. solium* de diferentes áreas geográficas do Brasil: (DF): Distrito Federal, (BA): Bahia, (MG): Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito, Minas Gerais e (SP): São Paulo; em amostras de soro, diluídas 1:200, grupo 1- a. neurocisticercose (n=49), grupo 2 - b. teníase (n=20), c. estrongiloidíase (n=20), d. esquistossomose (n=10), e. hidatidose (n=10), f. himenolepíase (n=8) e grupo 3 - g. indivíduos saudáveis (n=40). Diferença estatística significante entre duas proporções no extrato do DF em relação aos demais em a. (*): p= 0,02; em e. (**): p = 0,03.

4.7. Resultados obtidos no SDS-PAGE e no Teste "Western Blotting"

A Figura 9 demonstra os resultados da análise eletroforética dos extratos salinos por SDS-PAGE em gel a 12% corado pelo nitrato de prata, ilustrando os diversos peptídeos nos quatro extratos antigênicos.

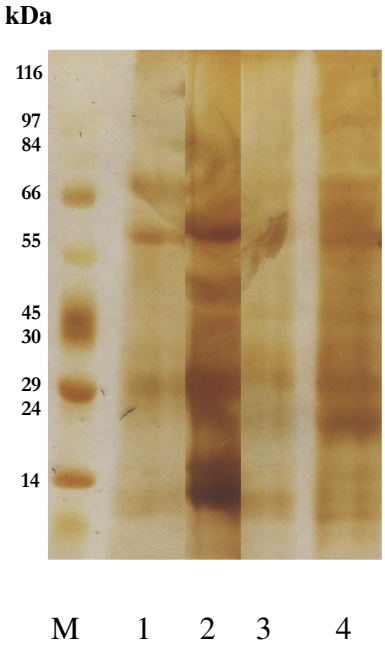

Figura 9 – O perfil eletroforético dos quatro extratos antigênicos de metacestódeos de *T. solium* por SDS-PAGE em gel 12% corado por nitrato de prata. Linhas: M) marcador de peso moleculare; 1) Distrito Federal; 2) Bahia; 3) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito-MG e 4) São Paulo.

As amostras de soro de 98 indivíduos, sendo 49 do Grupo 1, 39 do Grupo 2 e 10 do Grupo 3, foram analisadas por WB frente aos peptídeos antigênicos presentes nos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium*. As Figuras 10, 11, 12 e 13 demonstram os marcadores de pesos moleculares reconhecidos pelos anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* pelo WB, nas amostras de soro dos indivíduos do Grupo 1, NC ativa e inativa, Grupo 2 e Grupo 3; frente ao extrato salino do DF, BA, RM-MG e SP, respectivamente.

A Figura 14 apresenta as freqüências de reconhecimento de bandas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro dos indivíduos frente aos extratos salinos do DF, BA, RM-MG e SP nas amostras séricas de pacientes do Grupo1, com NC ativa (A) e inativa (B). As amostras de pacientes com NC ativa reconheceram o total de 12 peptídeos antigênicos, sendo que os pesos moleculares de 18, 24, 28-32, 39-40, 47-52, 64-68, 70, 80, 86, 95, 98 e 116 kDa foram reconhecidos no extrato salino de metacestódeos do DF. As bandas de 24, 47-52, 64-68, 70, 86 e de 95 kDa foram reconhecidas no extrato da BA. Os pesos moleculares aparentes de 24, 28-32, 39-42, 64-68, 70, 80, 86 e 116 kDa foram reativos no extrato de RM-MG. As bandas de 28-32, 47-52, 64-68, 80 e 86 kDa foram reconhecidas no extrato de SP.

O peptídeo de peso molecular aparente de 64-68 kDa foi reconhecido, exclusivamente, nas amostras séricas de pacientes com NC ativa nos quatro extratos salinos analisados (p=0,001); sendo que a freqüência de reconhecimento desse peptídeo foi de 57,89%, 79%, 89,5% e 89,5% nos extratos salinos do DF, BA, RM-MG e SP, respectivamente. Observou-se que no extrato DF, a reatividade da banda 64-68 kDa foi significativamente inferior em relação aos extratos do RM-MG e de SP (p=0,02); e as bandas de 24 e de 28-32 kDa apresentaram reconhecimento. A banda de 28-32 kDa apresentou freqüência de reconhecimento de 26,3%; 0%; 31,6% e de 36,84 % nos

extratos salinos do DF, BA, RM-MG e SP, respectivamente; sendo que foi significativamente mais elevada a freqüência de reconhecimento dessa banda nos extratos de RM-MG (p=0,01) e SP (p=0,03) em relação ao extrato da BA.

As amostras de soro dos 30 pacientes do grupo 1, com NC inativa, reconheceram, predominantemente, as bandas antigênicas de pesos moleculares de 86 kDa; 86 e 95 kDa; 86 kDa; 80 e 86 kDa nos extratos salinos do DF, BA, RM-MG e SP, respectivamente. Essas bandas apresentaram elevadas freqüências de reconhecimento em todas as amostras e, portanto foram consideradas inespecíficas para o diagnóstico de NC.

As amostras de soro dos 39 indivíduos do grupo 2 que foram analisadas pelo WB demonstraram diferenças significativas no reconhecimento de peptídeos antigênicos nos diferentes extratos analisados. As amostras dos pacientes com hidatidose foram as mais reativas (p=0,001) e reconheceram os peptídeos (22, 28, 38, 35, 40, 45, 50, 60, 68, 77, 86, 95 e 116 kDa) nos extratos analisados. Sendo que os peptídeos de 68 e 77 kDa apresentaram freqüência de reconhecimento superior nos quatro extratos em relação as demais infecções helmínticas (p<0,05). No entanto, essas bandas não foram relacionadas ao critério de positividade adotado no WB, e nenhuma amostra de soro de paciente com hidatidose reconheceu o marcador de 64-68 kDa.

Dentre as dez amostras de soro dos indivíduos do Grupo 3 que foram analisadas pelo WB, somente cinco reconheceram bandas antigênicas, que apresentaram pesos moleculares de 86 kDa; 86 e 95 kDa; 86 kDa; 80 e 86 kDa nos extratos salinos do DF, BA, RM-MG e SP, respectivamente.

A comparação da reatividade de anticorpos IgG anti-*T. solium* presentes em amostras séricas de indivíduos dos Grupos 1, 2 e 3 frente aos extratos salinos totais analisados nos testes ELISA e WB está demonstrada na Tabela 6. Os anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* apresentaram reatividade cruzada com hidatidose no

ELISA, sendo reativos em 90% das amostras analisadas no extrato do DF e de 70% nos demais extratos. O WB apresentou especificidade superior ao ELISA e no Grupo 1 o critério de positividade adotado permitiu distinguir as formas ativa e inativa da NC.

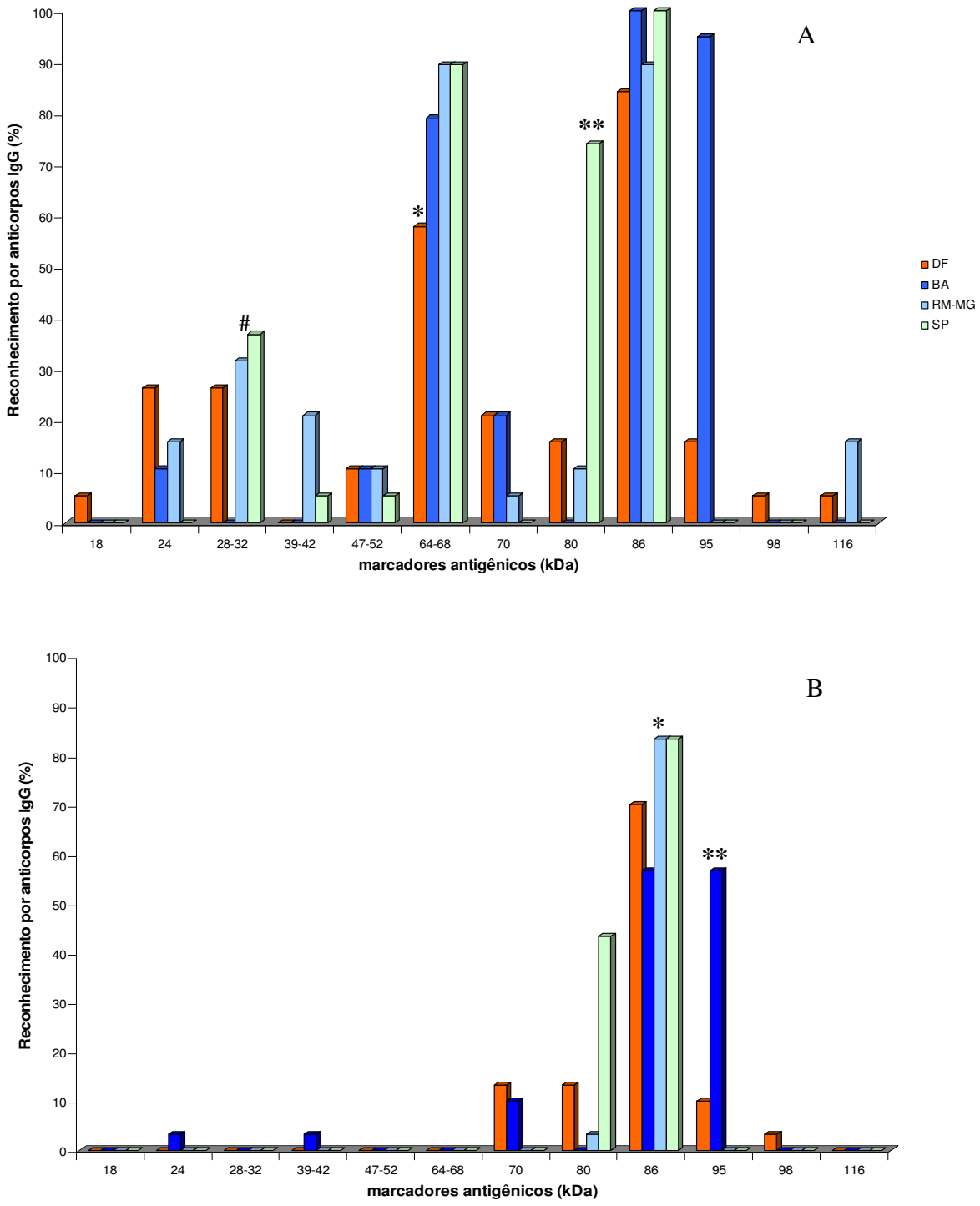

Figura 14 – Freqüência de marcadores antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgG anti-*T. solium* presentes nas amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (NC), diluídas 1:50, pelo "Western Blotting" frente aos extratos salinos de metacestódeos provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil: Distrito Federal (DF), Bahia (BA), Rio Mosquito (MG) e São Paulo (SP). A) 19 pacientes com NC ativa e B) 30 pacientes com NC inativa. (*, **, #): Diferenças estatísticas significante entre duas proporções $p < 0,05$ nas freqüências das bandas em relação aos extratos.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, a presença de polimorfismo no DNA de *T. solium* e a reatividade de anticorpos IgG, em amostras séricas de pacientes com NC e controles, frente aos extratos salinos de populações de metacestódeos provenientes de diferentes áreas geográficas, foram analisados pela primeira vez no Brasil.

A tecnologia da RAPD tem sido uma eficiente ferramenta no estudo da variabilidade genética intra-específica de diferentes espécies. Recentemente, foram comparadas as metodologias da RAPD, AFLP ("amplified fragment length polymorphism") e SSR ("simple sequence repeats") derivadas do PCR na caracterização de 27 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando que todas apresentaram resolução suficiente para detectar diferenças genéticas entre as linhagens desse organismo (GALLEGO et al., 2005).

As pesquisas sobre variabilidade genética em *T. solium* têm sido inferiores em número quando comparadas com numerosas investigações em *E. granulosus*, agente etiológico da hidatidose, mesmo assim estudos demonstraram variabilidade intra-específica em *T. solium* (NAKAO et al., 2002; GONZALEZ et al., 2002; VEGA et al., 2003; YAMASAKI et al., 2004).

Em nosso estudo foi possível distinguir as cinco populações de metacestódeos de *T. solium* com seis "primers" e dois deles foram suficientes na distinção dessas populações. O "primer" 26 (GGGTTTGGCA) diferenciou as populações RM-MG e UB-MG, e o 29 (TCGCCAGCCA) diferenciou as populações de DF, BA, SP e UB-MG entre si. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo de variabilidade genética em metacestódeos de *T. solium*, dissecados de suínos originários de três regiões do México, Honduras e Tanzânia, que demonstraram 88% de polimorfismo por RAPD em metacestódeos de *T. solium* (MARAVILLA et al., 2003b).

As distâncias genéticas verificadas nesse estudo sugerem que as amostras analisadas apresentaram diferenciação intra-específica. Esses resultados evidenciaram quatro grupos distintos, sendo um grupo constituído pelos metacestódeos das áreas da Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito (RM-MG) e de São Paulo (SP), que apresentaram maior semelhança entre si, embora essas populações se localizem em áreas distantes a 1.200 km. O segundo agrupamento engloba a população de metacestódeos de *T. solium* da área de Uberaba, Minas Gerais (UB-MG); essa amostra foi obtida de hospedeiro humano e apresentou 18% de distância genética em relação às amostras de RM-MG e SP. O terceiro grupo inclui os metacestódeos da Bahia (BA); e o último reúne a população de *T. solium* do Distrito Federal (DF); esses dois grupos apresentaram 1,5% de distância genética entre si e a maior diferenciação genética em relação às demais amostras. A semelhança genética dentro de cada grupo de isolados, provavelmente relaciona-se com migração humana e o comércio de suínos entre essas áreas conforme Vega et al. (2003).

As correntes migratórias humanas no Brasil são freqüentes, as pessoas migram em busca de trabalho e melhores condições de sobrevivência. Nas décadas de 80 e 90, foram freqüentes as migrações de indivíduos provenientes de cidades ou meio rural da região Nordeste para os centros urbanos da região Sudeste, principalmente para o Estado de São Paulo (WIKIPÉDIA, 2006), fato que provavelmente relaciona-se com o maior fluxo gênico entre parasitos. A criação de suínos para subsistência, em geral, em instalações precárias de higiene no peridomicílio, é freqüente nos municípios brasileiros e constitui fator de risco associado à transmissão da teníase por *T. solium* e de cisticercose humana (VIANNA et al., 1986; BIONDI et al., 1996).

A migração de pessoas e o comércio de suínos foram associados como fatores que interferem no aparecimento de NC em novas áreas e permitem o fluxo de variedades genéticas do parasito (DEKUMYOY et al., 2004). Estudo desenvolvido no

México demonstrou que o comércio de suínos foi mais ativo entre regiões próximas às zonas rurais do que entre povoados distantes e houve maior trânsito de pessoas portadoras de *T. solium* entre cidades vizinhas conforme demonstrado por Vega et al. (2003). Esses resultados diferiram dos dados obtidos nessa tese, em que as populações com maior semelhança foram as que apresentaram distância geográfica considerável entre si.

As distâncias geográficas podem atuar como barreiras que permitem o isolamento genético entre seres vivos da mesma espécie, fato não significante entre as populações de RM-MG e SP, pois essas distantes 1.200 km, apresentaram menor variabilidade genética entre si, provavelmente devido aos elevados níveis de migração humana no nosso país. Resultados semelhantes foram demonstrados em estudo de diferenças raciais na espécie humana, que analisou a distância genética para "loci" de proteínas entre as populações européia, asiática e africana do sub-Saara, demonstrando maior distância genética entre as populações locais. As populações de continentes diferentes apresentaram variabilidade genética consideravelmente pequena para a classificação de sub-espécies ou raças humanas (COSMIDES et al., 2003). A diferenciação genética entre indivíduos de uma mesma área geográfica pode ocorrer devido às pressões seletivas do ambiente, que nesse caso constitui o organismo do hospedeiro sobre o parasito.

Em relação aos pacientes com NC (Grupo1), cujas amostras séricas foram analisadas nesse estudo, verificou-se predominância de pacientes do sexo feminino e idade média de 42 anos. Na literatura há diferentes prevalências de NC em relação ao sexo do hospedeiro. A predominância de indivíduos do sexo masculino (58,2%) com NC foi evidenciada em estudo prospectivo de 55 pacientes com diagnóstico de NC e a média de idade de 42 anos (variando entre 15 e 72 anos), residentes no estado de São Paulo (MACHADO et al., 2002). Em uma avaliação de 45 pacientes chineses com diagnóstico

comprovado de NC, Ikejima et al. (2005) não demonstraram diferença estatisticamente significante na predominância da infecção entre os indivíduos do sexo masculino e feminino. A média de idade dos pacientes com NC sintomática demonstrada nesse estudo apresenta concordância com pesquisas nacionais e internacionais (AGAPEJEV, 2003; GARCIA, DEL BRUTTO, 2005). Em algumas helmintíases, como em esquistossomose mansônica observa-se prevalência da infecção em relação ao sexo; no entanto, na NC humana esse fato não está estabelecido (SCIUTTO et al., 2000).

Os testes imunológicos utilizados nesse estudo, demonstraram diferenças de reatividade de anticorpos IgG presentes nas amostras séricas de pacientes com NC em relação aos extratos antigênicos das quatro populações de metacestódeos de *T. solium* analisadas. As amostras de soros de pacientes com NC apresentaram índice de reatividade pelo ELISA mais elevado do que os demais grupos. A diferença estatisticamente significante na freqüência de positividade de amostras séricas de pacientes com NC foi demonstrada no extrato antigênico do DF, em relação aos demais extratos analisados. As diferenças de infectividade e patogenicidade da infecção por metacestódeos de *T. solium*, manifestam-se na diferença de reconhecimeno de antígenos do parasito pelos anticorpos do hospedeiro humano e relacionam-se, provavelmente com a variabilidade genética do parasito (CAMPBELL et al., 2006). Aliado as condições sanitárias rurais, predominantemente desfavoráveis, dos países em desenvolvimento que são preponderantes na propagação do agente parasitário, além de intensificar a evolução progressiva da diferenciação e variabilidade genéticas de *T. solium*, resultando em heterogeneidade clínica, patológica e imunológica da doença (VEGA et al., 2003).

A positividade do teste ELISA em amostras de soro de pacientes com outras helmintíases foi demonstrada, especialmente em amostras de indivíduos com diagnóstico de hidatidose. Este fato é freqüente, no entanto o teste ELISA constitui a

melhor escolha para a triagem de pacientes provenientes de áreas onde a cisticercose é endêmica (ITO, 2002). A reação cruzada observada nesse trabalho pode ser explicada pela proximidade filogenética entre os parasitos, que apresentam proteínas antigênicas semelhantes, visto que *T. solium* pertence ao Filo Plathyhelmintes que inclui *S. mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansônica, na Classe Cestoidea que inclui, também, *H. nana*, responsável pela himenolepíase e na Família Taeniidae na qual está classificada a espécie de *E. granulosus* (REY, 2001; HOBERG, 2006). A teníase, no Brasil, apresenta *T. solium* e *T. saginata* como agentes etiológicos, sendo que os pacientes com essa infecção, cujas amostras de soro foram avaliadas, apresentaram reatividade cruzada menor em relação a hidatidose. Esse fato pode estar relacionado à detecção de antígenos estágios específicos do parasito (HOBERG, 2006).

De acordo com outras pesquisas o diagnóstico sorológico da NC é influenciado pelos níveis de anticorpos produzidos durante a infecção (DEKUMYOY et al., 2004) e apresenta reatividade cruzada com outras infecções, principalmente com a hidatidose, teníase e himenolepíase (SCIUTTO et al., 2000: GARCIA, DEL BRUTTO, 2005).

Os pacientes com NC inativa apresentaram reatividade sorológica elevada pelo ELISA, resultados que confirmam a identificação da presença de anticorpos em amostras de soro refletem a infecção, atual ou passada e não apenas em sua apresentação neurológica. Os pacientes com cisticercose muscular ou subcutânea podem, também, apresentar resultado positivo pelo ELISA (DEL BRUTTO et al, 2001; FERRER et al., 2005). O poliparasitismo de indivíduos por helmintos constitui achado freqüente em países em desenvolvimento e apresenta forte associação com a reatividade sorológica cruzada no diagnóstico da cisticercose (FLISSER, 2006). A hidatidose é endêmica na região Sul do Brasil. Uma pesquisa desenvolvida nessa região, analisou 127 amostras de

soro de pacientes com helmintíases na detecção de anticorpos IgG frente a diferentes antígenos e foi demonstrada reatividade cruzada em amostras séricas de pacientes com esquistossomose e hidatidose pelo teste ELISA, frente ao extrato antigênico de líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium* (ISHIDA et al., 2003). A detecção sorológica de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro e LCR de pacientes mexicanos com NC e de indivíduos com outras parasitose provenientes de diferentes países foi avaliada por Gekeler et al. (2002) que demonstraram sensibilidade de 75% e 83% em amostras de soro e LCR, respectivamente. A reatividade cruzada foi verificada em 54% dos 26 pacientes com hidatidose, 19% dos 16 indivíduos com estrongiloidíase e 14% de sete pessoas com esquistossomose no ELISA (GEKELER et al., 2002).

Em estudo de reatividade de IgG pelo ELISA, utilizando antígenos de metacestódeos de *T. solium*, em amostras séricas de grupos de pacientes com infecções por helmintos, protozoários ou vírus demonstraram reconhecimento de anticorpos em 17/20 de amostras de soro de pacientes com hidatidose; 5/13 amostras de pacientes com esquistossomose e 1/2 pacientes com himenolepíase (FERRER et al., 2005).

Os resultados do teste WB foram interpretados, nesse estudo, de acordo com o critério de reatividade de bandas antigênicas descrito por Shiguekawa et al. (2000) e utilizado por outros autores (OLIVEIRA et al., 2006). O reconhecimento do marcador antigênico de peso molecular de 64-68 kDa foi exclusivo e imunodominate em amostras séricas de pacientes com NC ativa; resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al. (2006). Esse peptídeo foi demonstrado por Barcelos et al. (2001) com freqüência de reatividade imunodominante frente a anticorpos IgG presentes em amostras de LCR de pacientes com NC. O marcador antigênico de 65-70 kDa foi demonstrado por Simac et al. (1995) com freqüência de reconhecimento em amostras de LCR de pacientes com NC provenientes de uma ilha “La Réunion” localizada no Oceano Indico. A utilização de um

critério específico na análise dos marcadores antigênicos pelo WB permite o diagnóstico da cisticercose em amostras de soro de pacientes residentes em áreas onde essa doença é endêmica (PAWLOWSKI, ALLAN, SARTI, 2005). O WB apresentou elevadas sensibilidade e especificidade, no diagnóstico da cisticercose humana frente aos extratos salinos totais de diferentes populações de metacestódeos de *T. solium*.

No presente trabalho, o WB apresentou níveis de especificidade compatíveis com o EITB, pois as bandas reconhecidas nas amostras de indivíduos do grupo com outras helmintíases não foram relacionadas à positividade. O EITB foi descrito por Tsang, Brand, Boyer (1989) e utiliza sete glicoproteínas (de 13 a 50 kDa) de metacestódeos de *T. solium*, com especificidade de 100% em amostras de soro de indivíduos provenientes de áreas onde a cisticercose é endêmica. Em nosso estudo, as bandas de baixo peso molecular, que foram reconhecidas pelos anticorpos séricos apresentaram pesos moleculares de 18, 24, 28-32, 39-42 e 47-52 kDa, sendo que a banda de 28-32 kDa foi, significativamente, reconhecida nos extratos de RM-MG e de SP. As bandas de 8 e de 26 kDa foram descritas como específicas no diagnóstico sorológico da NC em amostras de soro e de LCR por Gottstein, Tsang e Schantz (1986).

Os marcadores de pesos moleculares de 80, 86, 95 e 98 kDa foram considerados inespecíficos para o diagnóstico da NC humana nesse estudo. A banda de 80 kDa, segundo Shiguekawa et al. (2000), constitui marcador que apresenta elevados índices de reatividade cruzada com outros parasitos. As bandas de 95 e de 98 kDa foram relacionadas ao antígeno B e à paramiosina, respectivamente, os quais são peptídeos altamente conservados nos cestodas (LARRALDE et al., 1990; SCIUTTO et al., 2000).

Os resultados obtidos nesse estudo contribuem para acrescentar dados à genética do parasito e, possivelmente, para a compreensão da heterogeneidade da sintomatologia que os pacientes com neurocisticercose (NC) apresentam.

6. CONCLUSÕES

- Os metacestódeos de *T. solium* provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil analisados nesse estudo apresentaram polimorfismo por marcadores RAPD;

- As freqüências de reatividade de anticorpos IgG anti-*T. solium* detectadas em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose apresentaram diferença significativa no extrato do DF em relação aos demais extratos salinos de metacestódeos provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil;

- A freqüência e quantidade de marcadores antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgG presentes em amostras de soro de indivíduos com neurocisticercose apresentaram diferenças significativas nos extratos salinos analisados

- As populações de *T. solium* analisadas nesse estudo apresentaram variabilidade genética e diferenças de antigenicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGAPEJEV, S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.3, p.207-216, 1996.

AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.61(3B), n.9, p.822-828, 2003.

AGUILAR-DIAZ, H., BOBES, R.J., CARRERO, J.C., CAMACHO-CARRANZA, R., CERVANTES, C., CEVALLOS, M.A., DAVILA, G., RODRIGUEZ-DORANTES, M., ESCOBEDO. G., FERNANDEZ, J.L., FRAGOSO, G., GAYTAN, P., GARCIARUBIO, A., GONZALEZ, V.M., GONZALEZ, L., JOSE, M.V., JIMENEZ, L., LACLETTE, J.P., LANDA, A., LARRALDE, C., MORALES-MONTOR, J., MORETT, E., OSTOA-SALOMA, P., SCIUTTO, E., SANTAMARIA, R.I., SOBERON, X., DE LA TORRE, P., VALDES, V., YANEZ, J. The genome project of *Taenia solium*. **Parasitology International**, v.55, p.S127-S130, 2006.

ALLAN, J.C., CRAIG, P.S. Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. **Parasitology International**, v.55, p. S75-S80, 2006.

ANTONIUK, S. Epidemiology of neurocysticercosis. **Revista de Neurologia**, v.29, n.4 p.331-334, 1999.

ÁVILA, G., TERAN, N., AGUILAR-VEGA, L., MARAVILLA, P., MATA-MIRANDA, P., FLISSER, A. Laboratory animal moldels for human *Taenia solium*. **Parasitology International**, v.55, p.S99-S103, 2006.

AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Softwtare, version 2.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2000, p.250.

BAERMANN, S. Eine Einfache Methode zur Auffindung Von Ankylostomum (Nematoden) - Larven in Erdproden. **Mededeel mit. h. Geneesk. Lab Weltevredem Feestbundel**, **Batavia,** p.41-47, 1917.

* referências e citações de acordo com a NBR-6023/2002 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas. Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro.

BARCELOS, I.S.C., MINEO, J.R., SILVA, D.A.O., FERREIRA, M.S., MOURA, L.P., BIONDI, G.F., COSTA-CRUZ, J.M. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n.3, p.219-226, 2001.

BARCELOS, I.S.C., FERREIRA, M.S., MOURA, L.P., BIONDI, G.F., COSTA-CRUZ, J.M. Use of the paired samples (cerebrospinal fluid and serum) in immunodiagnostic of active and inactive human neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.427-429, 2005.

BARKER, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis, **Parasitology**. v.99, p.S125-S146, 1989.

BARRAL, V., THIS, P. IMBERT-ESTABLET, D., COMBES, C., DELSENY, M. Genetic variability and evolution of *Schistosoma mansoni* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.59, n.2, p.211-221. 1993.

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

BIONDI, G.F., MUCCIOLO, R.G., NUNES, C.M., RICHTZENHAIN, L.J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. **Veterinary Parasitology**, v.64, n.4, p.261-266, 1996.

BRAGAZZA, L.M., VAZ, A.J., PASSOS, A.D., TAKAYANAGUI, O.M., NAKAMURA, P.M., ESPINDOLA, N.M., PARDINI, A., BUENO, E.C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cassia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblot using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.1, p.7-12. 2002.

BRAND, J.A., TSANG, V.C. A rapid immunoblot assay (western blot) to detect specific antibodies for human immunodeficiency virus, *Schistosoma mansoni* and *Taenia solium* (cysticercosis). **Journal of Immunoassay**, v.10, n.2-3, p.237-255, 1989.

BUENO, E.C., dos RAMOS MACHADO, L.R., 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., SCHEEL, C.M., VAZ, A.J., MACHADO, L.R., LIVRAMENTO, J.A., TAKAYANAGUI, O.M., TSANG, V.C., HANCOCK, K. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.3, p.278-283, 2005.

CAMPBELL, G., GARCIA, H.H., NAKAO, M., ITO, A., CRAIG, P.S. Genetic variation in *Taenia solium*, **Parasitology International**, v.55, p.S121-S126, 2006.

CASAS, I., POWELL, L., KLAPPER, P.E., CLEATOR, G.M. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, v.53, n.1, p.25-36, 1995.

CHAVARRÍA, A., FLEURY, A., GARCÍA, E., MÁRQUEZ, C., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. **Clinical Immunology**, v.116, n.3, p.271-278, 2005.

CHAVES-BORGES, F.A., MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios.** Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.

COPADO F., ALUJA A.S, MAYAGOITIA L., GALINDO F. The behavior of free ranging pigs in the Mexican tropics and its relationships with human faeces consumption. **Applied Animal Behaviour Science**, v.88, n.3-4, p.243-252, 2004.

COSMIDES, L., TOOBY, J., KURZBAN, R. Perceptions of race. **Trends in Cogntive Sciences**. v.7, n.4, p.173-179, 2003.

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

DEKUMYOY, P., WAIKAGUL, J., VANIJANONTA, S., THAIRUNGROJ, M., NAKAO, M., SAKO, Y., WATANABE, S., ITO, A. Cysticercosis: IgG-ELISA evaluations of peak 1 antigen and <30 kDa antigen of delipidized extract of *Taenia solium* metacestodes. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.35, n.1, p.1-9, 2004.

DEL BRUTTO, O.H. Neurocysticercosis. **Revista de Neurologia**, v.29, n.5, p.456-466, 1999.

DEL BRUTTO, O.H., SOTELO, J. Neurocysticercosis: An update. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n.6, p.1075-1087, 1988.

DEL BRUTTO, O.H., WADIA, N.H., DUMAS, M., CRUZ, M., TSANG, V.C., SCHANTZ. P.M. Proposal of diagnosis criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis**. Journal of the Neurological Sciences**, v.142, n.1-2, p.1-6, 1996.

DEL BRUTTO, O.H., RAJSHEKHAR, V., WHITE, A.C. Jr, TSANG, V.C., NASH, T.E., TAKAYANAGUI, O.M., SCHANTS, P.M., EVANS, C.A., FLISSER, A., CORREA, D., BOTERO, D., ALLAN, J.C., SARTI, E., GONZALEZ, A.E., GILMAN, R.H., GARCIA, H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, v.57, n.2, p.177-183, 2001.

DORNY, P., BRANDT, J., ZOLI, A., GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis, **Acta Tropica**,v.87, n.1 p.79-86, 2003.

EDDI, C., NARI, A., AMANFU, W. *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. **Acta Tropica**, v.87, n.1, p.145-148, 2003.

EDDI, C., KATALIN, de B., JUAN, L., WILLIAM, A., ANDREW, S., DANIELA, B., JOSEPH, D. Veterinary public health activities at FAO: cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v.55, p.S305-S308, 2006.

EOM KS, RIM HJ. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp n. **The Korean Journal of Parasitology**, v.31, n.1, p.1-6. 1993.

ESCOBAR-IZQUIERDO, A. La patología de la neurocisticercosis. **Gaceta Medica de México**, v.124, n.6, p.202-206, 1988.

ESPINOZA, B., RUIZ-PALACIOS, G., TOVAR, A., SANDOVAL, M.A., PLANCARTE, A., FLISSER, A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, n.4, p.536-541, 1986.

FAN, P.C. Taiwan *Taenia* and taeniasis. **Parasitology Today**, v.4, n.3, p. 86-88, 1988.

FERRER, E., CORTÉZ, M.M., CABRERA, Z., ROJAS, G., DÁVILA, I., ALARCON DE NOYA, B., PÉREZ, H.A., FERNANDEZ, I., ROMERO, H.U., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., GÁRATE, T. Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.8, p.568-576, 2005.

FLISSER, A. Where are the tapeworms? **Parasitology International**, v. 55, p.S117 – S120, 2006.

FLISSER, A., MADRAZO, I., DELGADO, H. Parasitos y ciclo de vida. In: **Cisticercosis Humana**, Editora El Manual Moderno, México, p.5-17, 1997, 176p.

GALÁN-PUCHADES, M.T., FUENTES, M.V. Human cysticercosis and larval tropism of *Taenia asiatica*. **Parasitology Today**, v.16, p.174, 2000.

GALLEGO, F.J., PÉREZ, A., NÚÑEZ, Y., HIDALGO, P. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.22, n.6, p.561-568, 2005.

GARCIA, H.H., DEL BRUTTO, O.H., The Cysticercosis Working Group in Peru. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. **Lancet Neurology**, v.4, n.10, p. 653-661, 2005.

GARCIA, H.H., GONZALEZ, A.E., EVANS, C.A.W., GILMAN, R.H., The Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, v.361, n.8, p.547-556, 2003.

GAUCI, C.G., LIGHTOWLERS, M.W. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis.* **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.112, n.2, p.173-181, 2001.

GEKELER, F.; EICHENLAUB, S.; MENDOZA, E.G.; SOTELO, J.; HOELSCHER, M.; LÖSCHER, T. Sensitivity and specificity of ELISA and Immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, n.3, p.227-229, 2002.

GONZÁLEZ, L.M., MONTERO, E., PUENTE, S., LÓPEZ-VELEZ, R., HERNÁNDEZ, M., SCIUTTO, E., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., GÁRATE, T. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.42, n.4, p.243-249, 2002.

GONZALEZ, A.E., GARCIA, H.H., GILMAN, R.H., TSANG, V.C., cisticercosis working group in Peru. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, v.87, n.1, p.103-109, 2003.

GONZALEZ, A.E., LOPEZ-URBINA, M.T., TSANG, B.Y., GAVIDIA, C.M., GARCIA, H.H., SILVA, M.E, RAMOS, D.D., MANZANEDO, R., SANCHEZ-HIDALGO, L., GILMAN, R.H., TSANG, V.C. Cysticercosis Working Group in Peru. Secondary transmission in porcine cysticercosis: description and their potential implications for control sustainability**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.3, p.501-503, 2005.

GOTTSTEIN, B., TSANG, V.C., SCHANTZ, P.M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.2, p.308-313, 1986.

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

HAWK, M.W.; SHAHLAIE, K.; KIM, K.D.; THEIS, J.H. Neurocysticercosis: a review. **Surgical Neurology**, v.63, n.2, p.123-132, 2005.

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

HOBERG, E.P. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. **Parasitology International**, v.55, S23 – S30, 2006

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

IKEJIMA, T.; PIAO, Z.X.; SAKO, Y.; SATO, M.O.; BAO, S.; SI, R.; YU, F.; ZHANG, C.L.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; KANAZAWA, T.; ITO, A.

Evaluation of clinical and serological data from *Taenia solium* cysticercosis patients in eastern Inner Mongolia Autonomous Region, China. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.8, p.625-630, 2005.

ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactives in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v.89, n.1, p.73-84, 2003.

ITO, A. Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. **International Journal for Parasitology**, v.27, n.10, p.1203-1211, 1997.

ITO, A. Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. **Parasitology International**, v.51, n.3, p.221-235, 2002.

ITO, A., YAMASAKI, H., NAKAO, M., SAKO, Y., OKAMOTO, M., SATO, M.O., NAKAYA, K., MARGONO, S.S., IKEJIMA, T., KASSUKU, A.A., AFONSO, S.M., ORTIZ, W.B., PLANCARTE, A., ZOLI, A., GEERTS, S., CRAIG, P.S. Multiple genotypes of *Taenia solium* – ramifications for diagnosis, treatment and control. **Acta Tropica**, v.87, n.1p.95-101, 2003.

JARDIM, E.A.G.V., LINHARES, G.F.C., TORRES, F.A.G., ARAÚJO, J.L.B., BARBOSA, S.M. Diferenciação específica entre *Taenia saginata* e *Taenia solium* por ensaio de PCR e duplex-PCR. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.166-172, 2006.

KAUKAS, A., DIAS NETO, E., SIMPSON, A.J.G., SOUTHGATE, V.R., ROLLINSON, D. A phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species base on randomly amplified polymorphic DNA. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.2, p.285-290, 1994.

KAZAN, K., MANNERS, J.M., CAMERON, D.F. Genetic relationships and variation in the *Stylosathes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, v.36, n.1, p.43-49, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.15, p. 680-685, 1970.

LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R.M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAZ, M.L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.114, n.9, p. 926-928, 1990.

LEWIN, B. **GENES VII**, 2 ed., Ed. Oxford Press, 2000, pp.1000.

LINO JÜNIOR, R. de S., RIBEIRO, P.M., ANTONELLI, E.J., FALEIROS, A.C.G., TERRA, S.A., REIS, M.A. dos, TEIXEIRA, V.P.A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração humanos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.617-622, 2002.

LIGHTOWLERS, M.W. Vaccines for prevention of cysticercosis. **Acta Tropica**, v.87, n.1, p.129-135, 2003.

LÓPEZ-MARÍN, L.M., MONTROZIER, H., LEMASSU, A., GARCÍA, E., SEGURA, E., DAFFÉ, M. Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerci. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.119, n.2, p. 33-42, 2002.

LOSS-FRANK, B. An update of Verster´s (1969) "Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus" (Cestoda) in table format. **Systematic Parasitology**, v.45, n.1, p.155-183, 2000.

LOWRY, V.H., ROSEBROUCH, N.J., FARR, A. L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.4, p.265-275, 1951.

MACHADO, A.J., CAMARGO, M.E., HOSHINO, S. Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas à lâminas de microscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.7, n.3, p.181-183, 1973.

MACHADO, L.R., LIVRAMENTO, J.A., VAZ, A.J., BUENO, E.C., MIELLI, S.R., BASTOULY, V., NÓBREGA, J.P.S. IgG intrathecal synthesis and specific antibody index in patients with neurocysticercosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo: v.60, n.2B, p.395-399, 2002.

MARAVILLA, P., VALERA, A., SOUZA, V., MARTINEZ-GORDILLO, M., FLISSER, A. Isozyme analysis of *Taenia solium* isolates from Mexico and Colômbia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.8, p.1049-1050, 2003a.

MARAVILLA, P., SOUZA, V., VALERA, A., ROMERO-VALDOVINOS, M., LOPEZ-VIDAL, Y., DOMINGUEZ-ALPIZAR, J.L., AMBROSIO, J., KAWA, S., FLISSER, A. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. **Journal of Parasitology**, v.89, n.6, p.1250-1254, 2003b.

McMANUS, D.P. Molecular technology: improving strategies for controlling hydatid disease and cysticercosis. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v.21, n.2, p.161-173, 1990.

McMANUS, D.P. Molecular discrimination of taeniid cestodes. **Parasitology International**, v.55, S31 – S37, 2006.

MONTERO, E., GONZÁLEZ, L.M., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., GÁRATE, T. *Taenia solium* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for human cysticercosis. **Journal of Chromatography B**, v.786, n. 3, p.255-269, 2003.

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

MWAMBETE, K.D., PONCE-GORDO, F., CUESTA-BANDERA, C. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. **Acta Tropica**, v.91, n. 1, p.87-93, 2004.

NAKAO, M., OKAMOTO, M., SAKO, Y., YAMASAKI, H., NAKAYA, K., ITO, A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. **Parasitology**, v.124, n.6, p.657-662, 2002.

NOYES, H.A., BELLI, A.A., MAINGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.1, p.98-105, 1996.

NUNES, C.M., LIMA, L.G.F., MANOEL, C.S., PEREIRA, R.N., NAKANO, M.M., GARCIA, J.F. Fecal specimes preparation methods for PCR diagnosis of human taeniosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São** Paulo, v.48, n.1, p.45-47, 2006.

OLIVEIRA, H.B., RODRIGUES, R.M., BARCELOS, I.S.C., SILVA, L.P., COSTA-CRUZ, J. Anti-*Taenia solium* metacestodes IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a Central-Western region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p.49-52, 2006.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OFICINA SANITARIA PANAMERICANA, OFICINA REGIONAL DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**. Epidemiologia y control de la teniasis-cisticercosis en America Latina**, OPAS, 1994, versión 3.0.

PAL, D.K., CARPIO, A., SANDER, J.W. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.68, n. 2, p.137-143, 2000.

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

PAWLOWSKI, Z., ALLAN, J., SARTI, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.11-12, p.1221-1232, 2005.

PLANCARTE, A., FLISSER, A., GAUCI, C.G., LIGHTOWLERS, M.W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.4 p.643-647, 1999.

PROCUNIER , J.D., FERNANDO, M.A., BARTA, J.R. Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. **Parasitology Research**, v.79, n.2, p. 98-102, 1993.

RAMADAN, N.I., SABER, L.M. Detection of genetic variabiltiy in nonhuman isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by the RAPD-PCR technique. **Journal Egypt of Society Parasitology,** v.34, n.2, p.679-689, 2004.

REY, L. **Parasitologia**, 3ª ed., Editora Guanabara Koogan, 2001, 856pp.

ROSENZVIT, M.C., ZHANG, L.H., KAMENETZKY, L., CANOVA, S.G., GUARNERA, E.A., McMANUS, D.P. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. **Parasitology**, v.118, n.5, p.523-530, 1999.

ROMÁN, G., SOTELO, J., DEL BRUTTO, O., FLISSER, A., DUMAS, M., WADIA, N., BOTERO, D., CRUZ, M., GARCÍA, H., BITTENCOURT, P.R.M., TRELLES, L., ARRIAGADA, C., LORENZANA, P., NASH, T.E., SPINA-FRANÇA, A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, n.3, p.399-406, 2000.

SCHANTZ, P.M. Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. **Parasitology International**, v.55, p.S7 – S13, 2006.

SCHANTZ, P.M., TSANG, V.C. The US center for disease control and prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. **Acta Tropica**, v.87, n.1, p.161-163, 2003.

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

SCOTT, J.C., McMANUS, D.P. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. **Tropical Medicine and Parasitology,** v.45, n.1, p.1-4, 1994.

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

SHORT, J.A., HEINER, D.C., HSIAO, R.L., ANDERSEN, F.L. Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.7, p.1635-1639, 1990.

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, n.4, p.229-231, 2002.

SIMAC, C., MICHEL, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., ESTERRE, P., MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v.81, n.1, p.132-136, 1995.

SOTELO, J., DEL BRUTTO, O.H. Brain cysticercosis. **Archives of Medical Research**, v.31, n.1, p.3-14, 2000.

SOTELO, J., GUERRERO, V., RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms: a study of 753 cases. **Archives of International Medicine**, v.145, n.3, p.442-445, 1985.

STEINDEL, M., DIAS NETO, E., PINTO, C.J., GRISARD, E.C., MENEZES, C.L., MURTA, S.M., SIMPSON, A.J., ROMANHA, A.J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **Journal Eukaryotic Microbiology,** v.41, n.3, p.261-267, 1994.

THOMPSON, R.C.A. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: ***Echinococcus* and Hydatid Disease**, Ed. THOMPSON, R.C.A., LYMBERY, A.J., p.1-50, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1995.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

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.159, n.1, p.50-59, 1989.

VEGA, R., PIÑERO, D., RAMANANKANDRASANA, B., DUMAS, M., BOUTEILLE, B., FLEURY, A., SCIUTTO, E., LARRALDE, C., FRAGOSO, G. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. **International Journal for Parasitology**, v.33, n.13, p.1479-1485, 2003.

VIANNA, L.G., MACEDO, V., COSTA, J.M., MELLO, P., SOUZA, D. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.19, n.3, p.149-156, 1986.

WAITUMBI, J.N., MURPHY, N.B. Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers**. Molecular and Biochemistry Parasitology**, v.58, n.1, p.181-185, 1993.

WEBBE, G. Human cysticercosis: parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v.64, n.1, p.175-200, 1994.

WEINBERG, M. Recheche des anticorps spécifiques dans la distomatose et la cysticercose. **C.R. Soc. Ed.** (Paris), v.66, p. 219, 1909.

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WHITE JR., A.C. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. **Annual Review of Medicine**, v.51, n.1, p.197-206, 2000.

WIKIPEDIA, 2006
http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Migra%C3%A7%C3%A3o_no_Brasil&oldid=1246773>. Acesso em: 17 Fev 2006

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEEY, S.F. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WUHRER, M., DENNIS, R.D., DOENHOFF, M.J., GEYER, R. Stage-associated expression of ceramide structures in glycosphingolipids from the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1524, n.2-2, p.155-61, 2000.

YAMASAKI, H., ALLAN, J.C., SATO, M.O., NAKAO, M., SAKO, Y., NAKAYA, K., QIU, D., MAMUTI, W., CRAIG, P.S., ITO, A. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.548-553, 2004.

YANCEY, L.S; DIAZ-MARCHAN, P.J.; WHITE, A.C. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia: v.7, n.1, p. 39-47, 2005.

ZARLENGA, D.S., La ROSA, G. Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within the genus *Trichinella*. **Veterinary Parasitology**, v.93, n.3-4, p.279-292, 2000.