



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

Vanessa da Silva Ribeiro

**Identificação de Peptídeos Sintéticos Ligantes à
Imunoglobulinas G de Pacientes com Neurocisticercose
por *Phage display***

Uberlândia – MG
2009



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

Vanessa da Silva Ribeiro

**Identificação de Peptídeos Sintéticos Ligantes à
Imunoglobulinas G de Pacientes com Neurocisticercose
por *Phage display***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

Uberlândia – MG
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- R484i Ribeiro, Vanessa da Silva, 1985-
 Identificação de peptídeos sintéticos ligantes à imunoglobulinas G de
 pacientes com neurocisticercose por *Phage display* / Vanessa da Silva
 Ribeiro. - 2009.
 78 f. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Cisticercose cerebrospinal - Teses. 2. Taenia solium - Teses.
 3. Teste imunoenzimático - Teses. 4. Imunodiagnóstico - Teses. I. Costa-
 Cruz, Julia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
 Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.831-002.951.21

DEDICATÓRIA

À Deus, pela oportunidade dada e pela força para vencer mais este obstáculo.

Aos meus pais, Antônio Ribeiro Pereira e Cleuza Ferreira da Silva Ribeiro, pelo amor, carinho e por todo apoio, tão imprescindíveis para que esta caminhada terminasse com sucesso.

À minhas irmãs, Rita de Kássia Ribeiro e Érika da Silva Ribeiro que sempre torceram por mim.

Ao meu grande amor, Rogério de Araújo, pelo companheirismo, cumplicidade, compreensão e apoio, tão importantes durante esta caminhada.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

À Profª Drª Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, confiança e compreensão durante todo o estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, por ter permitido a utilização das instalações do Laboratório de Nanobiotecnologia e pela grande colaboração e apoio.

À grande companheira de laboratório, Marianna Nascimento Manhanni, pela amizade, pela alegre convivência durante este período, dedicação e colaboração constante em todas as etapas. Sucesso, sempre!

À Rosângela Maria Rodrigues, Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Nágilla Daliane Feliciano, Talita Lucas Belizário, Daniela Silva Nunes e Henrique Tomaz Gonzaga pela convivência tão agradável e momentos de descontração no laboratório.

Ao pessoal do laboratório de Nanobiotecnologia, especialmente ao Rone Cardoso pela imensa colaboração, paciência e presteza.

Às funcionárias Maria do Rosário F. Gonçalves Pires e Maria das Graças Marçal pela ajuda.

Aos secretários da Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela amizade e auxílio em todos os momentos.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e ao CNPq pelo apoio financeiro

Enfim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
1 - INTRODUÇÃO.....	6
1.1 - Aspectos morfológicos.....	6
1.2 - Ciclo biológico.....	7
1.3- Aspectos epidemiológicos.....	9
1.4 - Relação parasito – hospedeiro.....	12
1.4.1 - Ação patogênica e resposta imune.....	12
1.4.2 - Sintomatologia.....	13
1.5 - Diagnóstico.....	14
1.6 - <i>Phage Display</i>	17
2 - OBJETIVOS.....	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 - Aspectos éticos.....	25
3.2 - Amostras de soro.....	25
3.2.1 - Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose (Grupo 1).....	25
3.2.2 - Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo <i>Taenia</i> sp. (Grupo 2).....	25
3.2.3 - Amostras de soro controle de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3).....	26
3.3 - Obtenção das formas metacestódeas de <i>T. solium</i>	26
3.4 - Preparo do extrato salino total de metacestódeos de <i>T. solium</i>	26
3.5 - Purificação da Imunoglobulina G por <i>beads</i> magnéticos.....	27
3.5.1 - <i>Dot blot</i> para confirmação da purificação das Imunoglobulinas.....	27
3.6 - Seleção de peptídeos – <i>Biopanning</i>	28
3.7 - Caracterização dos clones.....	30
3.8 - Obtenção e sequenciamento do DNA.....	31
3.9 - Análise dos dados por bioinformática.....	31
3.10 - Testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados.....	32
3.11 - Normas de Biossegurança.....	34
3.12 - Análise estatística.....	34
4 - RESULTADOS.....	36
4.1 - Purificação de imunoglobulinas por <i>beads</i> magnéticos.....	36
4.2 - <i>Biopanning</i> e titulações.....	37
4.3 - Extração de DNA dos fagos.....	38
4.4 - Sequenciamento.....	38
4.5 - Análise por bioinformática.....	39
4.6 - Testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados.....	52
5 - DISCUSSÃO.....	58
6 - CONCLUSÕES.....	64
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

A neurocisticercose (NC), resultado da presença dos metacestódeos de *T. solium* no sistema nervoso central constitui a forma mais grave da cisticercose, sendo a principal causa de epilepsia nos países em desenvolvimento. O aprimoramento de testes imunodiagnósticos que utilizem antígenos recombinantes se faz necessário diante da dificuldade de obtenção de suínos naturalmente infectados com metacestódeos de *T. solium*, para a produção de antígeno. O objetivo deste estudo foi identificar peptídeos recombinantes ligantes à imunoglobulinas G de pacientes com neurocisticercose por *phage display*, a partir de uma biblioteca randômica de peptídeos e verificar a imunorreatividade dos fagos selecionados pelo método imunoenzimático ELISA. Uma biblioteca de peptídeos randômicos expressados em bacteriófagos filamentosos foi utilizada numa estratégia de seleção contra as imunoglobulinas (IgG) purificadas de soro de pacientes positivos para NC, outras parasitoses e aparentemente saudáveis. As seqüências do DNA correspondente aos insertos dos fagos selecionados foram seqüenciados, traduzidos e analisados por bioinformática. Foram realizados testes de ELISA com os dez fagos selecionados contra os três grupos de pacientes (NC, outras parasitoses e saudáveis). A especificidade de ligação dos fagos ao *pool* de soros foi analisado por ELISA de competição. Os peptídeos apresentaram similaridades significativas com proteínas importantes do parasito *T. solium*. Todos os clones apresentaram eficiência de diagnóstico satisfatórias no teste ELISA variando de 90 a 95%. Alguns clones não apresentaram reatividade com o soro de pacientes infectados com *Echinococcus granulosus*, o que representa um grande avanço uma vez que esta reatividade cruzada é muito freqüente. Os dados de reconhecimento no teste de competição indicaram que os peptídeos selecionados podem mimetizar epítomos de *T. solium* e se ligar especificamente ao pool de soro de pacientes com NC. Conclui-se que os fagos identificados apresentaram peptídeos específicos para NC e são potenciais biomarcadores no diagnóstico da doença em amostras de soro.

Palavras-chave: Neurocisticercose; *phage display*, *Taenia solium*; ELISA; peptídeos.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC), presence of *Taenia solium* metacestodes in the central nervous system is the most serious form of cysticercosis and is the cause of epilepsy in countries under development. The improvement of immunodiagnostic tests which use recombinant antigens is importance because of the difficulty of obtaining parasites from naturally infected pigs for the preparation of metacestodes *T. solium* metacestodes crude antigen. The aim of this study was to select phagotopes by phage display peptide library specific to IgG present in serum samples from patients with NC and confirm the immunoreactivity from the selected phagotopes in the ELISA test for the diagnosis of human neurocysticercosis in serum samples. We used in the selection procedure a phage display peptide library in a selection strategy against the immunoglobulins (IgG) purified from serum samples positively diagnosed for NC, other parasitoses and apparently health individuals. The DNA sequences corresponding to the inserts of the selected phage clones were sequenced, translated and analyzed by bioinformatics. ELISA tests were performed with the ten phagotopes selected against the three groups of patients (NC, other parasitoses and healthy). The binding specificities of the recombinant phages to the pool of serum samples were analyzed by competitive ELISA. Peptides showed significant similarities with important proteins from *T. solium*. All phagotopes presented satisfactory sensitivities and specificities in the ELISA test, varying from 52.5% to 100% and 86.3% to 100%, respectively. Some phagotopes did not reacted with serum samples from patients infected with *Echinococcus granulosus*, what is an advance since this cross reaction is very commonly reported. The recognition data indicated that the selected peptides could indeed mimic the epitopes on *T. solium* and bind specifically to the pool of serum with NC. We concluded that the identified phage clones displayed specific peptides to NC, and are potential biomarkers for NC diagnosis in serum samples.

Keywords: Neurocysticercosis; phage display, *Taenia solium*; ELISA; peptides.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
aa	Aminoácidos
BCIP	Bromochloroindolyl phosphato
BSA	Soroalbumina bovina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Co-A	Co-aglutinação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
EITB	<i>Enzyme-linked Immunelectrotransferblot</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER2738	<i>Escherichia coli</i> cepa ER2738
Grupo 1	Pacientes com diagnóstico definitivo de NC
Grupo 2	Pacientes infectados por outros parasitos
Grupo 3	Indivíduos aparentemente saudáveis
H ₂ O ₂	Peróxido de Oxigênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HAI	Hemaglutinação Indireta
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HPJ	Método de Hoffmann, Pons e Janer
HRP	Horsehadish Peroxidase
IE	Índice ELISA
IFI	Imunofluorescência Indireta

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosidase
IR	Índice de Reatividade
FO	Frequência observada
Khz	Kilo Hertz
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LP	Peroxidação de Lipídeos
M	Molar
mg	média geométrica
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NaI	Iodeto de Sódio
NBT	Nitroblue tetrazolium
NC	Neurocisticercose
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
kDa	Kilodalton
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	PBS acrescido de Tween 20
PBST-M	PBS-T acrescido de leite desnatado

PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VI do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
S	Extrato Salino de Metacestódeos de <i>Taenia solium</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNC	Sistema Nervoso Central
Ta	Temperatura ambiente
TBST	Trifosfato de sódio com Tween 20
TC	Tomografia Computadorizada
TPmy	Paramiosina de <i>Taenia solium</i>
Tris HCl	Tris acrescido de Ácido Clorídrico
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo

1 – INTRODUÇÃO

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

A teníase é uma parasitose intestinal provocada pelo estágio adulto de *T. solium* (Linnaeus, 1758), ou *T. saginata* (Goeze, 1782) cujo habitat é o intestino delgado do homem. A espécie *T. solium* é universalmente aceita como a única a ocasionar a cisticercose humana, resultado da ingestão de ovos deste parasito. Neste caso as formas metacestódeas podem acometer diversos órgãos e tecidos, tais como: olhos, músculos e sistema nervoso central (SNC) (GARCIA; DEL BRUTTO, 2000), estas formas podem também ser encontradas na glândula salivar (MAHAJAN; KHURANA; SETIA, 2007). Saenz e colaboradores (2008) demonstraram que em humanos os cisticercos são mais frequentemente encontrados nos ventrículos e espaço subaracnóideo, na base do cérebro, (11,8%; 25,9%, respectivamente) enquanto em suínos estes são mais frequentemente encontrados no parênquima (44,4%).

A neurocisticercose (NC), resultado da presença dos metacestódeos de *T. solium* no SNC constitui a forma mais grave da cisticercose, sendo a principal causa de epilepsia nos países em desenvolvimento (PATEL; JHA; YADAV, 2006; VELASCO et al., 2006), e têm sido observada em associação à outras doenças e também à tumores (NIIZUMA et al., 2007), além de casos raros com quadros de parkinsonismo (LÓPEZ et al., 2008).

Um estudo com indivíduos idosos, com e sem cisticercose, indicou que a imunosenescência associada com alterações imunológicas causadas pela cisticercose resultam em condições favoráveis para o desenvolvimento de neoplasias nos indivíduos acometidos pela parasitose (CAVELLANI et al., 2007).

1.1- Aspectos morfológicos

O parasito se caracteriza por ausência completa do aparelho digestivo, segmentação do corpo em proglotes dotadas cada uma de um sistema reprodutor hermafrodita; úteros em forma de tubos longitudinais ramificados, testículos numerosos e poros genitais situados nas margens das proglotes com disposição irregular (REY, 2001).

O estágio adulto localiza-se no intestino delgado humano e apresenta o corpo leitoso, levemente rosado, com comprimento médio de 1,5 a 4 metros. O escólex é piriforme e apresenta quatro ventosas e uma dupla coroa de acúleos, com número variando entre 25 a 50, inseridas em um rostro situado entre as ventosas. Os acúleos possibilitam melhor adesão e maior penetração do escólex entre as vilosidades intestinais (DEL BRUTTO; SOTELO, 1993). O estróbilo corresponde ao restante do parasito e possui aspecto de uma fita, composto por um grande número de segmentos, as proglotes, que variam de 800 a 900 por parasito e se desenvolvem a partir do colo, estas apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas. Decorridos três a quatro meses de infecção, as proglotes grávidas de *T. solium* contêm cerca de 40.000 ovos cada uma e o útero possui de 7 a 16 ramificações laterais do tipo dendrítica (FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

Os ovos medem aproximadamente 30 a 45 µm de diâmetro, são esféricos e de aspecto radial, envoltos por uma espessa membrana protetora denominada embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto provido de três pares de acúleos, também denominado de oncosfera (SCIUTTO et al., 2000). Estes são bastante resistentes, podendo permanecer viáveis por mais de oito meses sob condições ambientais adequadas (loais quentes e úmidos), aumentando assim os riscos de transmissão (PÊSSOA; MARTINS, 1982; HOBERG, 2002; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

As formas metacestódeas constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, com aproximadamente 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, apresentando no seu interior, líquido vesicular e um escólex invaginado. O líquido vesicular é claro e composto por água, sais minerais, proteínas, uréia, creatinina, ácido úrico, além de colesterol e glicose (PÊSSOA; MARTINS, 1982; SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993).

1.2 – Ciclo biológico

Cisticercose é uma condição reconhecida desde os mais remotos tempos; todavia, somente em 1855 teve seu ciclo esclarecido por Friedrich Küchenmeister. Em um ensaio, colocou metacestódeos na dieta alimentar de prisioneiros condenados; necropsiados meses após, identificou tênia no intestino da maioria deles (GARCIA et al., 2003a; HAWK et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006). Desta maneira, definiu que o ciclo biológico implica em dois hospedeiros, ou seja, heteroxeno.

No ciclo biológico o homem se infecta através da ingestão de carne suína, crua ou mal cozida, contendo formas metacestódeas viáveis de *T. solium*. Após três ou quatro meses, a

tênia alcança a maturidade e os pacientes começam a eliminar as primeiras proglotes juntamente com as fezes, em número de dois a cinco segmentos, duas a três vezes por semana, ocasião na qual o helminto mede aproximadamente dois metros de comprimento (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003).

No ciclo natural o suíno, hospedeiro intermediário, se infecta por meio da ingestão de ovos do parasito, neles as larvas se desenvolvem entre nove e 10 semanas e seu tamanho varia de 1,5 a 12,5 mm. Os ovos sofrem ação da pepsina no estômago e perdem o embrióforo. No intestino, por ação dos sais biliares, ocorre a ativação do embrião hexacanto ou oncosfera, que uma vez liberado, movimenta-se ativamente em direção às vilosidades intestinais, onde penetra com o auxílio de seus acúleos, encaminhando-se posteriormente para as vênulas, atingindo as veias e os vasos linfáticos mesentéricos, sendo transportado até outros órgãos e tecidos. A oncosfera evolui para formas metacestódeas pequenas e translúcidas (HAWK et al., 2005).

O homem ao ingerir carne crua ou mal cozida de suínos ou bovinos infectados com formas metacestódeas viáveis de *T. solium*, *T. saginata* ou *T. asiatica* desenvolverá a teníase. No tubo digestivo do homem, por ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, as formas metacestódeas são liberadas das vesículas através de um processo de desenvaginação do escólex e as ventosas fixam-se à mucosa do intestino delgado. O rostro eleva-se entre as vilosidades do jejuno, onde ancora firmemente os seus acúleos, após esta fase tem se início o crescimento da tênia (DEL BRUTTO; SOTELO, 1993; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

As proglotes grávidas são eliminadas de 60 a 70 dias após a ingestão da carne contaminada com os metacestódeos. Somente o homem tem sido encontrado com infecção natural por *T. solium*, ainda que experimentalmente tenha sido possível infectar algumas espécies de primatas (REY, 2001).

Na cisticercose humana o homem é hospedeiro intermediário acidental de *T. solium*, quando ingere ovos viáveis do parasito presentes na água ou verduras foliáceas contaminadas com ovos ou ainda por: heteroinfecção que consiste na manipulação direta de água e alimentos contaminados com fezes humanas ou manipulação indireta através da irrigação e/ou fertilização com água e/ou esterco contaminados; auto-infecção externa que consiste na ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio indivíduo portador da teníase, resultado de maus hábitos higiênicos; auto-infecção interna resultante de movimentos antiperistálticos ou de vômitos que permitem a algumas proglotes retornarem ao estômago e sofrerem a ação do suco digestivo, permitindo a eclosão dos embriões infectantes (REY, 2001; TAKAYANAGUI;

LEITE, 2001; GARCIA et al., 2003a, HAWK et al., 2005). Além da auto-infecção interna, há relatos de meios alternativos de transmissão dos ovos de *T. solium* como coprofagia nos psicopatas, pelo ar e por moscas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

A forma larvária pode atingir os mais variados tecidos, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, cavidade oral e SNC (LIMA et al., 2004; PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005).

1.3 - Aspectos epidemiológicos

O complexo teníase-cisticercose em humanos engloba, duas doenças distintas, com sintomatologia e epidemiologia totalmente diferentes: a teníase e a cisticercose. A urbanização desordenada, vigilância sanitária deficiente, ausência de saneamento básico e educação sanitária são os principais fatores que potencializam esse complexo. Essa zoonose incide em países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, principalmente os da Ásia, África e América Latina (FLISSER et al., 2003; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003; KUMAR, 2004; MEDINA et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose acomete 50.000.000 de indivíduos em todo mundo provocando aproximadamente 50.000 óbitos anualmente. Estima-se que o Brasil gaste aproximadamente US\$85 milhões no tratamento de complicações da NC (PAL; CARPIO; SANDER, 2000). Além das consequências sociais e econômicas para cada indivíduo e sua família, destacam-se também as repercussões para o sistema de saúde e de previdência social (ITO et al., 2003; HAWK et al., 2005; RAJKOTIA et al., 2007).

Após encontro internacional sobre *T. solium* e o complexo teníase-cisticercose, com especial foco no leste e sul da África, realizado em Arusha, Tanzânia – África, em agosto de 2002, vários autores reafirmaram o problema de saúde pública da teníase-cisticercose na América Latina, Ásia e África Central e Ocidental. A reunião ainda demonstrou que este parasito encontra-se difundido também na África Oriental e Meridional (DORNY et al, 2003; SARTI, RAJSHEKHAR, 2003).

Na América Latina, calcula-se que a taxa de prevalência de NC e lesões oculares é de 100 e 30 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, atingindo cerca de 350.000 pessoas (PINTO et al., 2002). A enfermidade foi encontrada em 17 países latino-americanos, sendo prevalente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guatemala, México e no Peru. O complexo teníase-cisticercose constitui um problema na Argentina, Chile, Costa Rica, Haiti, Panamá,

República Dominicana e na Venezuela, mas a transmissão é esporádica. Em alguns países deste continente são registrados apenas casos importados, com no caso do Canadá, Cuba, Guiana Francesa, Jamaica, Paraguai, Suriname e Trinidad e Tobago (ANTONIUK, 1999).

A cisticercose acomete milhares de indivíduos nos países menos desenvolvidos (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; MEDINA et al., 2005) e em países desenvolvidos com alta taxa de imigração de áreas endêmicas (WHITE Jr, 2000; DeGIORGIO; PIETSCH-ESCUETA; TSANG, 2005; KRAFT, 2007, SIKASUNGE et al., 2007), emergindo como um sério problema na saúde pública em vários países (WILLINGHAM; ENGELS, 2006).

Os mecanismos de transmissão da cisticercose homem-suíno, homem-homem têm como fator primordial as condições sócio-econômicas e culturais do ser humano, uma vez que este é o único hospedeiro definitivo da teníase, não existindo reservatórios silvestres. Dentre essas condições destacam-se as sanitárias, como falta de higiene pessoal e de saneamento básico, com contaminação da água e de alimentos com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta do parasito (FLISSER et al., 2003; GARCIA et al., 2003b; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003). Outro fator importante para manter a endemia de cisticercose numa dada região geográfica é o sistema primitivo de criação de suínos, pois permite o contato destes animais com fezes humanas mantendo o ciclo de vida de *T. solium*. Esse fator, aliado ao hábito de ingestão de carne suína mal-cozida (cozimento ideal é por 30 minutos a 77°C), aumenta a prevalência da teníase estritamente relacionada com a cisticercose (SCIUTTO et al., 2000; HOBERG, 2002). Um estudo no sul da África apontou prevalência de 64,4% de *T. solium* em suínos, reafirmando o papel deste animal na manutenção desta parasitose (KRECEK et al., 2008).

Um estudo realizado no México por Huerta e colaboradores (2008) demonstrou uma forte correlação entre a contaminação do solo com ovos de *Taenia* sp. e o diagnóstico de NC nos habitantes destas áreas.

Verificando a prevalência de anticorpos anti cisticerco em humanos na província de Vellore no sul da Índia Prabhakaran et al. (2008) encontraram 15,9% de prevalência entre os moradores da cidade e 17,7% dentre os das áreas rurais. Neste estudo, dentre todas as famílias da província em aproximadamente um terço delas havia pelo menos um membro positivo para anticorpos anti-cisticerco.

No Brasil, a prevalência de cisticercose humana nas diversas regiões geográficas foi estimada em um estudo soroepidemiológico, desenvolvido no Laboratório de Cisticercose da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Através de diagnóstico imunológico detectaram-se índices de positividade que variaram entre grupos naturais de diversas regiões do país,

sendo 8,1% na região Sudeste; 5,8% no Nordeste; 5,3% no Centro-Oeste e 3,5% no Sul do país (VIANNA et al., 1986).

A incidência de cisticercose no Brasil em estudos soroepidemiológicos de acordo com levantamento realizado por Agapejev (2003), não considerando as comunidades indígenas, varia de 0,68 a 6,2%, sendo mais freqüente em hospitais psiquiátricos (38,5%) que na população geral estudada (0,8% em crianças e 2,3% em adultos). Em comunidades indígenas, a incidência de cisticercose é 29,4% .

A NC tem sido apresentada com freqüência nos estados do sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, principalmente em indivíduos dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás, sendo o gênero feminino mais acometido (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; BRAGAZZA et al., 2002; AGAPEJEV 2003; MENDES et al., 2005; BENEDETTI et al., 2007).

Não considerando as diferenças regionais, a incidência de NC nos diversos serviços de Neurologia e Neurocirurgia do Brasil, incluindo os hospitais gerais, varia de 0,03 a 13,4% nos estudos clínicos, e de 0,12 a 9% em necropsias. Exclusivamente nos hospitais gerais, a freqüência observada de NC é 1,94 a 2,03%, mostrando o menor valor (0,19%) no estado de São Paulo e o maior (4,8%) no estado do Paraná. Em hospitais psiquiátricos do estado de Minas Gerais, a freqüência de NC corresponde a 12,2% (AGAPEJEV, 2003).

Na região Centro-Oeste, Oliveira et al. (2006), em um estudo soro-epidemiológico, demonstraram a endemicidade (11,3%) da cisticercose humana na cidade de Catalão – Goiás, localizada a 100 Km de Uberlândia.

Na região do Triângulo Mineiro, Costa-Cruz et al. (1995) verificaram a ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas no período de 1971 a 1993 em Uberlândia-MG e detectaram prevalência de 1,4%, sendo a localização mais freqüente o SNC. Gobbi et al. (1980) relataram que em 2.306 necropsias realizadas em indivíduos falecidos em Uberaba-MG foram encontrados 2,4% de casos de cisticercose e destes 66% foram de NC.

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

Embora os fatores que se relacionam com a endemicidade do complexo teníase-cisticercose sejam conhecidos, há poucos estudos sobre o impacto de estratégias de controle. Recentemente, foram investigados, por simulações através de modelos matemáticos, os

efeitos de três grupos distintos de intervenções de controle (KYVSGAARD; JOHANSEN; CARABIN, 2007), porém, há a necessidade de aprimoramento de técnicas para melhorar o controle desta doença por razões econômicas e médicas (PAWLOWSKI, 2008).

A identificação dos mecanismos da resposta imune que interagem com o parasito para induzir proteção ou injúria pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias mais fortes e seguras para a prevenção e tratamento da NC (SCIUTTO et al., 2007).

1.4 - Relação parasito – hospedeiro

Vários estudos em modelos experimentais têm investigado os mecanismos da resposta imune provocados contra a forma metacestódea de *T. solium*. Alguns desses apresentam claramente heterogeneidade da resposta imune humoral, existência de mecanismos evasivos e o fato que a resposta imune pode proteger ou prejudicar o hospedeiro (CARPIO, 2002).

1.4.1 - Ação patogênica e resposta imune

A entrada das oncosferas no organismo humano não é acompanhada de manifestações clínicas talvez por ser pequeno o número de larvas que empreendem sua migração através da parede intestinal. Alcançando o ponto de fixação o parasito começa seu processo patogênico pela compressão mecânica e deslocamento de tecidos e estruturas, decorrentes da localização e crescimento do cisticerco e o processo inflamatório que geralmente envolve o parasito e pode estender-se à estruturas vizinhas (REY, 2001).

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

A forma metacestódea pode persistir por longos períodos, em muitos casos por anos, através das ações de seus produtos de excreção e secreção, que modulam a resposta imune do hospedeiro sem licitar uma reação inflamatória, a ausência ou redução da inflamação é resultado da secreção de serina proteases, que inibem a ativação do complemento, a ativação

de linfócitos e a produção de citocinas, com destaque para as interleucinas (IL) IL-2, IL-5 e IL-10 (SCIUTTO et al., 2007; WANG et al., 2008).

Em contraste, a resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacéstódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática, através da proliferação de linfócitos e posterior diferenciação em células efetoras tipo Th1 e Th2, com produção de várias citocinas, ou de células plasmáticas, e anticorpos específicos. Há um equilíbrio parasito – hospedeiro que é mantido como resultado da habilidade do parasito sobreviver no hospedeiro por longos períodos (CARPIO, 2002; SCIUTTO et al., 2007).

A patologia, a clínica e a resposta imunológica ao parasito estão relacionadas e dependem tanto da localização, do número, do tamanho e da fase de desenvolvimento em que se encontram os cisticercos, como da reação dos tecidos parasitados (WHITE Jr, 2000; DEL BRUTTO, 2005).

Na resposta humoral, há predominância de imunoglobulina G (IgG), aumento menos acentuado de IgE e IgM no soro de pacientes e inflamação do tipo celular, crônica, com numerosos linfócitos e plasmócitos (REY, 2001; NASCIMENTO, 2003). Na NC clinicamente severa, cisticercos colapsados e necróticos são encontrados rodeados por um infiltrado celular proeminente. Algumas lesões mostram vários linfócitos e células do plasma, macrófagos, células gigantes multinucleadas e poucos eosinófilos, há também edema significativo e áreas de necrose tissular, acredita-se que a osteoponina (ativador de linfócitos T) possa estar relacionada com a inflamação no perfil de resposta Th1 e na formação de granuloma na cisticercose ativa (SCIUTTO et al., 2000, WANG, et al., 2008).

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

1.4.2 - Sintomatologia

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

A NC também não possui sintomatologia característica, podendo ser confundida com outras síndromes neurológicas. As apresentações clínicas mais frequentes são: epilepsias (YEH; WU, 2008), hipertensão intracraniana (hidrocefalia ou pseudotumoral), doença de

“Parkinson” (BOPPRE et al., 2001; SA et al., 2005), além de outros sintomas como tonturas, convulsões, déficit motor, movimentos involuntários e distúrbios comportamentais (HAMED, EL-METAAL, 2007), crises depressivas (FORLENZA et al., 1998) e cefaléia (SOUSA et al., 1998). No caso da forma racemosa, onde a localização habitual do parasito é o espaço subaracnóide, sendo mais freqüente nas cisternas basais e na convexidade cerebral, são observadas meningites crônicas e aracnoidites (ADITYA et al., 2004).

As manifestações clínicas da doença podem variar de assintomáticas a episódios graves. Em algumas regiões endêmicas, estudos de autopsias demonstraram uma freqüência de 43,3% a 91% de indivíduos assintomáticos com NC (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

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

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

A variedade de sintomas observada em pacientes com NC é associada com a geração de produtos reativos pelas células inflamatórias, estes produtos podem causar danos à membrana de células induzindo a peroxidação de lipídeos (LP) liberando radicais livres. Pacientes com NC possuem níveis maiores de LP, especialmente aqueles com sintomas graves, uma vez que a presença de radicais livres pode favorecer o desenvolvimento de sintomas graves, mesmo em pacientes sob tratamento antiinflamatório (RODRIGUEZ et al., 2008).

A severidade dos sintomas desta doença é geralmente associada com a resposta inflamatória crônica, sugerida pela persistência do antígeno, que também podem ser influenciada por glicoconjugados expressos pelos metacestódeos de *T. solium* (ALVAREZ, RIVERA, TEALE, 2008).

1.5 – Diagnóstico

O diagnóstico clínico da cisticercose é difícil de ser realizado em pacientes assintomáticos, estando associado nos sintomáticos a alterações fisiológicas provocadas pela

localização das formas metacestódeas. Devido ao polimorfismo das manifestações neurológicas, comuns a outras doenças do SNC e também pela co-existência de cisticercos em múltiplos estágios há dificuldade de diagnóstico e manejo clínico (GARCIA et al., 2005; HAWK et al., 2005; YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE Jr, 2005, ENSENAT, et al., 2007).

O diagnóstico da neurocisticercose se baseia geralmente na combinação de dados clínicos, epidemiológicos, radiológicos e sorológicos (HAWK et al., 2005). Ressonância Magnética (RM) e/ ou Tomografia Computadorizada (TC) são as ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e específicas. Entretanto, devido a seu alto custo e disponibilidade restrita, eles podem ser limitados ao uso nos países em desenvolvimento e com altas taxas de infecção. As manifestações clínicas não são específicas e não há um método fácil de confirmar o diagnóstico de NC (YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE Jr, 2005). O desenvolvimento de teste imunológicos, que se baseiem na detecção de anticorpos específicos no soro e líquido cefalorraqueano (LCR), resultam em ferramentas confiáveis para o diagnóstico da NC. A maioria dos testes que utilizam antígenos totais perdem em sensibilidade e especificidade, reações cruzadas ocorrem frequentemente com outras parasitoses, especialmente equinococose cística e multilocular, causadas pelo estágio larval de *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, respectivamente (KONG et al., 1992).

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 últimos critérios classificaram o diagnóstico da NC em definitivo e provável, no entanto, os mesmos não foram vastamente avaliados em países onde a NC é endêmica (YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE Jr, 2005). O critério padrão ou absoluto para o diagnóstico de NC inclui (i) demonstração histológica do parasito em biópsia ou material de operação, (ii) lesões císticas mostrando o escólex por TC ou RM são patognomônicos (KRAFT, 2007) e (iii) visualização fundoscópica do parasito em casos de cisticercose intraocular (DEL BRUTTO et al., 1996).

Dados soropidemiológicos que se baseiam em estudos de neuroimagem têm identificado um grupo de indivíduos soropositivos sem evidências de doença neurológica por TC, chamando a atenção para o fato de nem todas as infecções por cisticercose atingirem o SNC. A soropositividade sem evidência de envolvimento neurológico pode indicar um quadro subclínico, cisticercose fora do SNC, ou desenvolvimento de uma imunidade protetora (GARCIA et al., 2007).

O imunodiagnóstico da cisticercose humana constitui na detecção de anticorpos contra antígenos da forma metacestódea de *T. solium*, em amostras de soro, LCR, saliva ou sangue em papel de filtro, alcançando quase sempre papel central no diagnóstico da neurocisticercose (COSTA, 1986). Dentre os testes imunológicos destacam-se, a Reação de Fixação de Complemento (RFC) (FERREIRA et al., 1997), a Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI) (COSTA, 1986), a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) padronizada por Machado; Camargo; Hoshino (1973), o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) inicialmente aplicada no diagnóstico de cisticercose por Arambulo et al. (1978) e padronizado no Brasil por Costa et al. (1982) em amostras de LCR e o *Immunoblotting* (*Enzyme-Linked Immunoelctrotransferblot* - EITB) padronizado por Tsang; Brand; Boyer (1989).

Como técnicas alternativas *Western blot*, *Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot* e outras técnicas de purificação têm sido desenvolvidas. Entretanto, estes testes têm algumas limitações, desde a falta sensibilidade para se detectar infecções por um único cisticerco até problemas de especificidade em áreas endêmicas, por anticorpos não específicos devido à varias outras infecções (DORNY et al., 2003).

Nos últimos anos vários pesquisadores têm testado novas técnicas para diagnosticar a NC: Parija et al. (2004) utilizaram o teste de co-aglutinação (CO-A) para detecção de antígenos de metacestódeos de *T. solium* na urina de pacientes com NC, encontrando sensibilidade e especificidade moderadas; Lee et al. (2005) testaram uma proteína de 10 kDa recombinante de *T. solium* expressada em uma bactéria para diagnosticar a esta doença por *immunoblot*; Ferrer et al. (2007) utilizaram insertos de cDNA clonados e purificados para detecção de NC ativa através do teste ELISA com amostras de soro e LCR, obtendo alta sensibilidade e especificidade; e Machado et al. (2007) avaliaram frações obtidas pela purificação do extrato salino de *T. solium* através do Triton X-114 no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana, encontrando resultados satisfatórios; outros autores têm testado antígenos variados para o diagnóstico de NC pelo teste *Dot Blot* (MANDAL et al., 2008; SHUKLA et al., 2008).

A utilização de marcadores moleculares tem sido amplamente estudada com o objetivo de definir padrões de diversidade genética e variação interespecífica para *Taenia* sp. e aprimorar os marcadores de diagnóstico (HOBERG, 2002).

1.6 – *Phage Display*

Atualmente existem métodos artificiais capazes de gerar um grande número de moléculas distintas para depois selecionar dentre elas os melhores candidatos com relação à atividade desejada para novos compostos. O princípio baseia-se na geração de uma biblioteca contendo um conjunto de variantes que envolvem todas as possíveis combinações dos peptídeos ou proteínas de interesse. Dentre estas metodologias, encontramos as bibliotecas combinatórias de peptídeos e a expressão na superfície de bacteriófagos (*phage display*). Esta metodologia tem provado ser uma técnica muito eficiente na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões de diferentes peptídeos ou proteínas.

Desde a sua descrição por Smith em 1985, a tecnologia de *phage display*, exposição de biomoléculas em fagos, têm apresentado utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências. Este autor foi o pioneiro na expressão da enzima de restrição Eco RI como a fusão da proteína três (pIII) do capsídeo do fago.

Uma biblioteca biológica consiste de um *pool* de microorganismos expressando diferentes polipeptídeos. Cada microorganismo carrega apenas uma seqüência de DNA ou RNA codificante para certo peptídeo, representando um clone. Cada clone na biblioteca pode ser propagado expressando o mesmo peptídeo (MERSICH; JUNGBAUER, 2008).

Bacteriófagos ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando pilus sexual como receptor. As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *Escherichia coli* via pilus F consiste de DNA de fita simples incluso em uma cápsula protéica (RUSSEL, 1991). A partícula viral esquematizada na Figura 1 é composta por cinco proteínas estruturais, presentes no capsídeos pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX.

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram infecção lítica em *E. coli*, mas preferencialmente induzem à um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

A proteína do fago mais utilizada para apresentar peptídeos é a pIII, que apresenta 3-5 cópias por vírion e é sintetizada com um sinal no peptídeos N-terminal que é clivado durante sua translocação na membrana interna, ela é responsável pela formação do corpo cilíndrico do capsídeo. A proteína pIII madura possui 406 aminoácidos (aa), sua porção C-terminal se encontra no citosol a N-terminal no periplasma, e um domínio de membrana simples ancora a proteína à membrana. A porção N-terminal permite a inserção de longos fragmentos peptídicos (MERSICH; JUNGBAUER, 2008).



Figura 1 – Estrutura do fago. pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX representam proteínas do fago. Peptídeos exógenos são expressos geralmente na pIII ou pVIII (ARAP, 2005).

A maior proteína do capsídeo é a pVIII, que também pode ser utilizada para a exposição de peptídeos. Esta proteína é sintetizada como um precursor necessário para a inserção da pVIII na membrana citoplasmática da célula bacteriana hospedeira. A proteína madura possui 50 aa e até 6 aa podem ser inseridos nesta proteína sem rompê-la (GREENWOOD; WILLIS; PERHAM, 1991).

A pVI do capsídeo é menos utilizada nos procedimentos de exposição (SIMONS; KONINGS; SCHOENMAKERS, 1981). A Figura 2 demonstra a exposição de peptídeos em diferentes proteínas do capsídeo do fago.

Das cinco proteínas presentes no capsídeo viral existem aproximadamente 2.800 cópias de 50 aa da proteína 8 (pVIII). Os monômeros da pVIII estão presentes na partícula como uma α -hélice, exceto 5 resíduos da extremidade amino-terminal que estão apresentadas fora da partícula. De 10-13 resíduos da extremidade carboxi-terminal formam a parede interna do cilindro. Esta região contém 3 resíduos de lisina carregadas positivamente que se localizam em uma hélice anfifílica. As extremidades carboxi e amino terminal de uma molécula de pVIII têm seus resíduos conectados com a mesma região de outra molécula de pVII estabilizando o cilindro protéico (BARBAS et al., 2001).

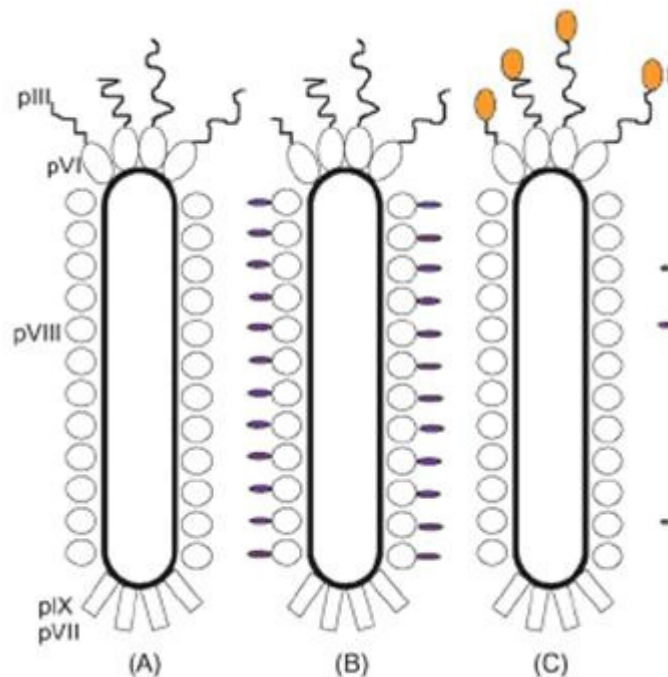


Figura 2 - Representação esquemática do fago filamentosos (A) Fago selvagem, (B) Exposição de peptídeos fundidos à pVIII, (C) Exposição de peptídeos fundidos à pIII (MERSICH; JUNGBAUER, 2008).

Em uma extremidade da partícula existem 5 cópias de cada uma das proteínas hidrofóbicas pVII e pIX (33 resíduos de aa da pVII e 32 da pIX). Estas proteínas não são bem conhecidas, porém estudos sugerem que uma interaja com o DNA e a outra esteja exposta na superfície. A outra extremidade contém aproximadamente 5 moléculas de 112 resíduos de aa na pVI e 406 na p III. A estrutura da pVI não é muito conhecida, sabe-se apenas que ela interage com a p III (BARBAS et al., 2001).

Este sistema de *phage display* foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aa) (PHIZICKY; FIELDS, 1995). As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos de modo que a proteína codificada seja expressa na superfície do fago como um produto de fusão a uma das proteínas de sua superfície (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

A técnica é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificante de milhares de variantes de certos ligantes (peptídeos, proteínas ou fragmentos destas) no interior do genoma dos fagos, fusionado ao gene codificante de uma das proteínas do capsídeo deste fago (geralmente pIII, mas também pVII, pVIII ou p IX). A fusão com a proteína do capsídeo é incorporada às novas partículas de fago que são montadas no espaço periplasmático da

bactéria. A expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura, resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético reside no interior do fago (BENHAR, 2001).

O *phage display* permite a seleção de peptídeos e ou proteínas, incluindo anticorpos e peptídeos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A grande vantagem dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAY; HIGHMITH, 2002).

Esta conexão entre genótipo e fenótipo permite o enriquecimento do fago específico, através da utilização de um alvo imobilizado, *biopanning* ou seleção, é um processo no qual é realizada a incubação dos fagos contra um alvo, os que não se ligam são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição, o *pool* de fagos específicos é amplificado para ciclos posteriores de seleção para o enriquecimento do conjunto de fagos específicos contra o alvo (SMITH, 1985).

Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm sido muito utilizadas no estudo das interações entre antígeno e anticorpo (BIRCH-MACHIN et al., 2000) estes trabalhos demonstraram a obtenção de peptídeos específicos pela seleção de fagos com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto mimetopos, os que imitam antígenos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos.

O sucesso da seleção por *phage display* depende da complexidade da biblioteca: a maior diversidade de clones dentro da biblioteca aumenta a probabilidade de conter seqüências que ligarão a um determinado alvo com maior afinidade (NOREN; NOREN, 2001).

Bibliotecas de peptídeos randômicos compreendem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho (10^7 - 10^9), onde suas seqüências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aa em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. A construção destas bibliotecas é feita principalmente pela inserção de oligonucleotídeos degenerados aleatoriamente sintetizados quimicamente no gene que codifica a proteína do capsídeo (AZZAY; HIGHSMITH, 2002; DYBWAB et al., 2003).

Esta metodologia tem se mostrado útil não apenas para o mapeamento de interações proteína-proteína como na identificação de moléculas alvo importantes para o desenvolvimento de vacinas e drogas contra parasitos como *Plasmodium* sp., causador de malária e *Brugia malayi*, causadora de filariose linfática (GNANASEKAR et al., 2008;

LANZILLOTTI; COETZER, 2008), assim desenvolvimento veículos de entrega de vacinas por si próprios (BENHAR, 2001).

Através da técnica de *Phage display* Gazarian et al. (2000), mapearam epítomos da região N-terminal de TPmy (paramiosina de *T. solium*), que são altamente imunogênicos nesta molécula. Utilizando diferentes métodos de seleção e eluição, identificaram peptídeos com similaridade à proteína em questão, sugerindo a identificação de um epítomo linear e descontínuo, com prováveis propriedades de determinantes imunodominantes, reveladas análises computacionais de antigenicidade. Esta técnica tem sido utilizada no entendimento de doenças provocadas por vírus, bactérias, protozoários e parasitos e a interação entre seus antígenos e a resposta imune do hospedeiro, na busca de mapear epítomos ou desenvolvimento de vacinas.

A capacidade de fagos recombinantes de entregar antígenos para a vacinação contra cisticercose suína foi testada, demonstrando uma capacidade protetora desta vacina contra a doença (MANOUTCHARIAN et al., 2004).

Antígenos de *T. crassiceps* forma isolados de um biblioteca de cDNA e avaliados sua utilização no diagnóstico da NC, 3 clones foram obtidos e reconheceram anticorpos presentes no LCR e soro de pacientes com NC confirmada (ROBLES et al., 2005).

A seleção por afinidade de peptídeos de bibliotecas de fagos utilizando LCR de pacientes foi sugerida como uma ferramenta atrativa para o desenvolvimento de novos reagentes para um teste diagnóstico simples e sensível e para o entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese da NC (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Com a técnica de apresentação em fagos, podemos agora testar genes de interesse em grande escala, na busca de um conjunto de proteínas que interagem, e que vem sendo chamado interatoma. A busca destes interatomas promete expandir os limites criados com os projetos de genoma e permitem agora inferir acerca de como estes genes se relacionam, explicando o indivíduo fenotipicamente (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Além das várias utilizações da técnica *in vitro* ela pode ser realizada *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos e os fagos, ligados por afinidade, são eluídos e analisados (ARAP, 2005). Embora esta abordagem venha sendo utilizada apenas em animais, Arap et al. (2002) utilizaram o *biopanning in vivo* em humanos para o mapeamento de receptores ligantes de vasos sanguíneos de um paciente com câncer.

Considerando a severidade dos sintomas, o pleomorfismo de achados clínicos de pacientes com NC, inclusive crianças, e a endemicidade desta doença na região de Uberlândia, novas metodologias para pesquisa de anticorpos circulantes devem ser incessantemente investigadas. Avanços nesta área permitirão melhor integração da clínica, do imunodiagnóstico e da neuroimagem, contribuindo assim com o diagnóstico e o tratamento desta grave doença.

Vistas as dificuldades dos testes sorológicos para detecção da cisticercose e NC, têm sido desenvolvidas nos últimos anos bibliotecas de peptídeos randômicos expressos na superfície de fagos, aumentando o interesse desta técnica (*Phage display*) como fonte de identificação de um grande número de epítomos e mimetopos.

A aplicação de bibliotecas de peptídeos em fagos para a identificação de anticorpos específicos ao nível de aa traz informações importantes sobre mecanismos moleculares de doenças e ainda possibilita novas ferramentas úteis no diagnóstico. Uma vez que esta estratégia não requer informações detalhadas sobre o antígeno natural, é possível identificar agentes responsáveis por doenças com etiologia obscura utilizando apenas o soro do paciente e uma biblioteca de peptídeos.

Uma das utilizações mais difundidas tem sido para o descobrimento e mapeamento de epítomos de anticorpos. A principal vantagem de se identificar epítomos através de bibliotecas randômicas de peptídeos dispostos em fagos é que não há necessidade de se conhecer o local de reconhecimento do antígeno pelo anticorpo (IRVING et al., 2001). Além disso, muitos epítomos antigênicos têm sido identificados através desta técnica (DROMEY et al., 2006; YANG et al., 2005; WU et al., 2006). Além de sua utilização nos últimos anos esta estratégia tem sido realizada para se identificar epítomos relacionados a doenças autoimunes como artrite reumatóide, púrpura trombocitopenica e esclerose múltipla (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Várias aplicações das bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido realizadas com sucesso, tais como mapeamento de epítomos, desenvolvimento de vacinas e identificação de peptídeos miméticos de ligantes não peptídicos, preparação de anticorpos monoclonais pela utilização de bibliotecas de fagos geradas pela imunização *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC); estudo de interações proteína-proteína, além da utilização de fagos como veiculadores na entrega de drogas contra células cancerosas (IRVING et al., 2001; HOF; HOEKE; RAATS, 2007; BAIR et al., 2008; BAR; YACOBY; BENHAR, 2008; MATSUMOTO et al., 2008).

Em diversos contextos é altamente desejável mapear os epítomos de uma região específica do ligante protéico natural. Caso o epítomo seja contínuo e não dependente de conformação, bibliotecas de peptídeos randômicos proporcionam uma maneira fácil e barata de alcançar este objetivo. O receptor (alvo biológico) é utilizado para selecionar peptídeos randômicos ligantes, e as seqüências motivo nos peptídeos selecionados são comparadas às seqüências de aa críticos constituintes do ligante natural do alvo biológico, possibilitando o mapeamento de epítomos de uma região específica (PRUDÊNCIO, 2008).

As vantagens da utilização da técnica são a habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, a possibilidade de produzir proteínas solúveis, o baixo custo, o fácil manuseio e a rapidez (SMITH; PETRENKO, 1997). Uma aplicação particular é a identificação de novos peptídeos bioativos pela seleção contra receptores de superfície celulares imobilizados ou em células intactas (SILVA JR et al., 2002).

Fagos também são comumente utilizados como partículas imunogênicas para a geração de anticorpos contra peptídeos recombinantes expressos nas regiões aminotermiais de proteínas de superfície, e reagir cruzadamente com alvo original, indicando que mimetopos expressos poderiam ser utilizados como candidatos de subunidades vacinais (YANG; SHIUAN, 2003).

T. solium ainda não está bem caracterizada à nível molecular e esta nova técnica (*phage display*) pode definir epítomos que podem ser utilizados para detecção de anticorpos presentes em amostras de pacientes com NC, para se desenvolver um teste imunodiagnóstico simples e sensível, além de prover informações sobre os mecanismos moleculares da doença (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Diante da importância do diagnóstico da NC, parasitose endêmica no Estado de Minas Gerais, e da dificuldade de obter extratos antigênicos purificados que demonstrem altos índices de sensibilidade e especificidade, faz se necessário à aplicação de técnicas que minimizem os resultados falsos positivos ou de falsos negativos.

2 – OBJETIVOS

- ✓ Identificar peptídeos recombinantes ligantes à imunoglobulinas G (IgG) de pacientes com neurocisticercose por *phage display*;
- ✓ Purificar anticorpos (IgG) por *beads* magnéticos para seleção de peptídeos, a partir de uma biblioteca randômica de peptídeos, por *biopanning*;
- ✓ Caracterizar os peptídeos selecionados no *biopanning* por sequenciamento;
- ✓ Determinar os antígenos potenciais mais imunogênicos e seus prováveis domínios funcionais (epítomos) através da utilização de programas de bioinformática;
- ✓ Verificar a imunorreatividade dos fagos selecionados pelo método imunoenzimático ELISA.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), sendo o número de referência 235/07.

3.2 - Amostras de soro

As amostras biológicas de pacientes com neurocisticercose foram obtidas por meio da alíquota que seria desprezada, após os exames de rotina, pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG (HC-UFU). As amostras de soro de pacientes com teníase e outras parasitoses foram colhidas a partir de resultados positivos de exames de fezes realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. As amostras do grupo controle foram obtidas de indivíduos da comunidade que consentiram em participar do projeto. Foram obtidas 120 amostras de soro, divididas em três grupos:

3.2.1 – Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose (Grupo 1)

Foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (1996). Sob tais critérios, um diagnóstico definitivo de NC se baseia na presença de um critério absoluto que pode ser a demonstração histológica do parasito por biópsia, visualização do escólex da forma metacestódea por TC ou RM ou a visualização direta do parasito na subretina através do exame de fundo de olho; a presença de dois critérios principais, um critério secundário e um critério epidemiológico levam ao diagnóstico desta doença.

3.2.2 – Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (Grupo 2)

Com o objetivo de verificar a reatividade cruzada nos métodos imunológicos, foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes infectados por: *Ancilostomídeos* (n=5), *Ascaris*

lumbricoides (n=5), *Echinococcus granulosus* (n=4), *Enterobius vermicularis* (n=4), *Hymenolepis nana* (n=4), *Schistosoma mansoni* (n=4), *Strongyloides stercoralis* (n=4), *Taenia* sp. (n=6) e *Trichuris trichiura* (n=4).

As amostras de soro foram colhidas de indivíduos com exames parasitológicos de fezes positivos após a análise de três amostras fecais pelos métodos de HPJ e/ou Baermann-Moraes (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934; BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), sendo todas triadas pelo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses-UFU.

3.2.3 – Amostras de soro controle de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3)

Foram utilizadas 40 amostras de soro de indivíduos voluntários, assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ e Baermann- Moraes (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934; BAERMANN, 1917; MORAES, 1948). Estes indivíduos apresentaram sorologia negativa para NC, utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* e negaram histórico anterior de teníase-cisticercose.

3.3 – Obtenção das formas metacestódeas de *T. solium*

Os metacestódeos de *T. solium*, que já estavam disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses – UFU foram obtidos de músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados, lavados em solução salina (NaCl, 0,15 M) por quatro vezes, identificados e armazenados a – 20°C.

3.4 – Preparo do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*

Foram utilizados 50 metacestódeos íntegros ou rompidos de *T. solium* para o preparo do extrato salino total (S), de acordo com Costa (1986), com algumas modificações. Os metacestódeos foram triturados em graal e ressuspensos em 2,5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col[®], USA) por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil) a 40 kHz por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonização com 2,5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a 4 °C por duas horas sob agitação lenta e

posteriormente centrifugada a 12.400 x g (Du Pont Sorvall® Products Newton, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato S.

3.5 - Purificação da Imunoglobulina G por *beads* magnéticos

A purificação de imunoglobulinas foi realizada através de *beads* magnéticos a partir de 100 µl do *pool* de soros de 10 pacientes com NC, disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da Universidade Federal de Uberlândia.

O mesmo procedimento foi realizado para a purificação de anticorpos de pacientes com outras parasitoses e indivíduos aparentemente saudáveis.

Foram colocados em um microtubo 100 µl de *beads* de proteína G (DynaBead Protein G), que foram lavados 3 vezes com tampão MES 0,1 M, pH 5,0; em seguida 100 µl do *pool* de soros foi acrescentado, e incubado sob agitação por 30 minutos. Em seguida os *beads* foram lavados com tampão MES e a eluição ocorreu com a adição de 30 µl de tampão citrato 0,1 M pH 2,0, no separador magnético o sobrenadante foi retirado com as imunoglobulinas G (IgG) remanescentes. O pH foi neutralizado com 1:3 de tampão Tris-HCl (1 M) pH 9,1.

Estimou-se a quantidade de anticorpos obtida pelo método de detecção e quantificação de proteínas descrito por Jonhstone e Thorpe (1987), onde a Concentração da amostra = Absorbância à 280 nm X Fator de diluição/ 1,36.

3.5.1 – *Dot blot* para confirmação da purificação das Imunoglobulinas

No experimento de *Dot-Blot*, uma membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 2 µl de cada *pool* de IgG purificada (NC, outras parasitoses e aparentemente saudáveis) por *spot*. A membrana foi incubada a Ta, até secarem os *spots*, lavada três vezes por 5 minutos cada com TBS-T (TBS + 0,1% volume/volume de Tween 20). Após as lavagens, a membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com 1 ml de tampão de bloqueio (TBS-T 0,1% - leite em pó desnatado 5%). Após o bloqueio a membrana foi lavada mais três vezes como anteriormente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina 1:5000 (*Sigma Chemical*) em tampão de bloqueio e incubação por mais 1h temperatura ambiente. A reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate -*Sigma*). Cada tira possuía um controle positivo e um negativo.

3.6 - Seleção de peptídeos – *Biopanning*

Para a seleção dos peptídeos recombinantes (expressos na proteína III do capsídeo de fagos filamentosos), reativos com os anticorpos descritos no item 3.5, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aa (Ph.D-12 mer- New England Biolabs). O procedimento de seleção foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações (Figura 3).

Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com 150 µl/poço das IgG anteriormente purificadas, a 100µg/ml, diluídas em tampão bicarbonato 0.1 M (pH 8.6) com posterior incubação *overnight* a 4°C, sob agitação lenta em câmara úmida.

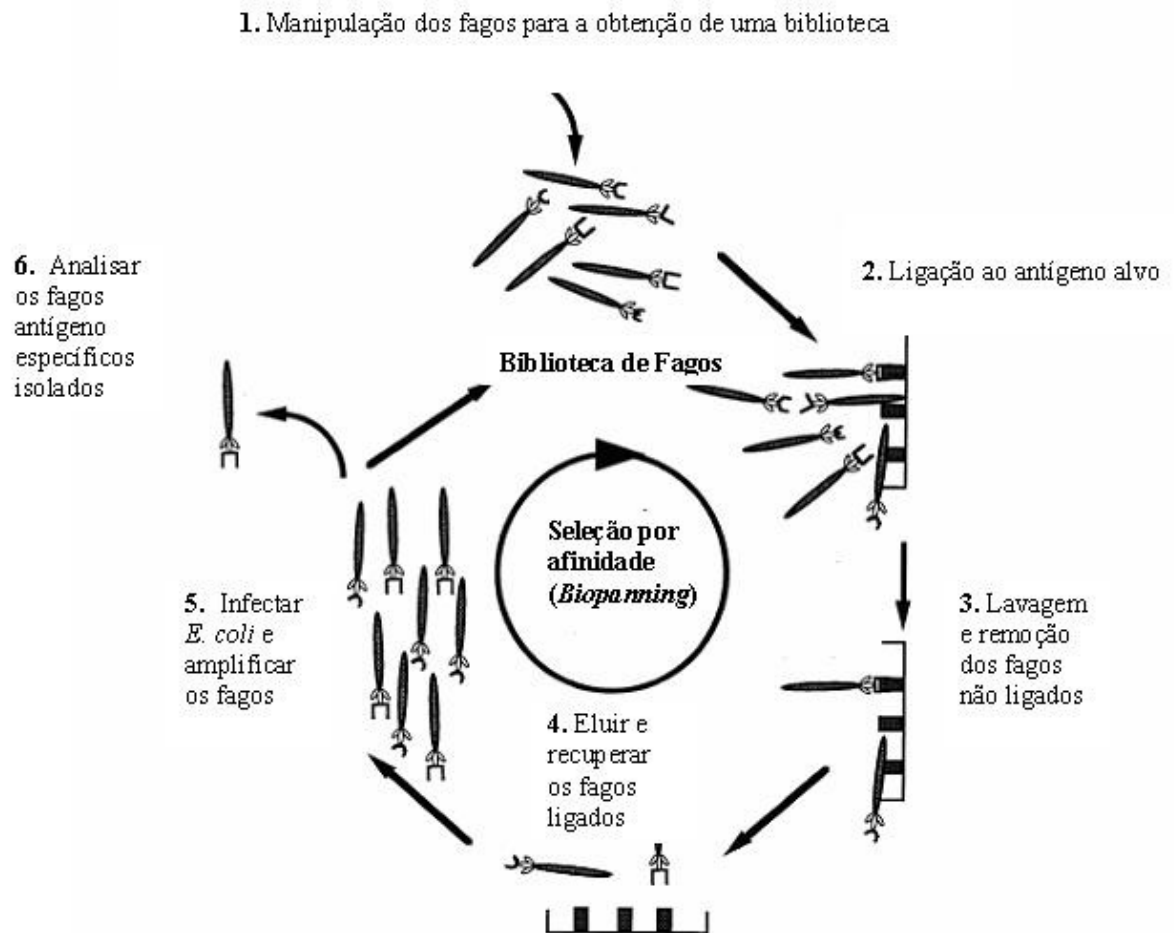


Figura 3 - *Biopanning*, a biblioteca de fagos é sujeita a diversos ciclos de seleção por afinidade incluindo a captura dos fagos com antígeno, lavagem para remover os fagos não ligados, eluição para recuperar os fagos ligados e amplificação em *Escherichia coli*. Quando o enriquecimento adequado for alcançado os clones são isolados e caracterizados (BENHAR, 2001).

Em seguida, a placa foi seca batendo-a contra papel de filtro para remover a solução residual, para a realização do bloqueio da mesma. O bloqueio se deu pela adição de 300 µl/poço de tampão de bloqueio (NaHCO₃ 0,1M, pH 8,6; BSA 5mg/mL), 1 h a 4°C, sob agitação lenta. Após a incubação, lavou-se a mesma por 6 vezes com 200 µl/poço de TBS-T (tris HCl 50mM- pH 7,5, NaCl 150mM – Tween 20 0,1%) por um minuto, sendo seca, em seguida, com papel de filtro para então receber 10 µl da biblioteca de fagos diluído em 90 µl de TBS-T, que foram colocados no poço sensibilizado com IgG de pacientes com outras parasitoses, nos outros poços foi colocado 20 µl de TBS para que estes não ficassem secos.

Incubou-se a mistura anticorpo - fago por 1 hora sob agitação lenta à temperatura ambiente (Ta) e em seguida os fagos não ligados foram transferidos para o poço sensibilizado com IgG de indivíduos aparentemente saudáveis, e em seguida os que não se ligaram foram passados para o poço sensibilizado com IgG de indivíduos positivos para outras parasitoses, por último os fagos que não se ligaram foram colocados no poço com a IgG de pacientes com NC para que àqueles que não fossem específicos à doença ficassem ligados nos outros poços, realizando desta forma seleções negativas. Os fagos não ligantes à IgG de pacientes com NC foram descartados e a placa lavada mais 10 vezes com 200 µl de TBS-T 0,1%, sendo em seguida preparada para a eluição dos fagos ligantes às IgG de pacientes com NC com 100 µl de tampão de eluição (extrato total de metacestódeos de *T. solium* 200 µg/ml em TBS-T) por 40 minutos à Ta. O eluato foi transferido para um *eppendorf* e mantido sob refrigeração.

Titulou-se uma pequena quantidade de amostra deste eluato (1 µL) e o restante, foi utilizado para re-amplificação, realizada em 20 mL de cultura de *Escherichia coli* (ER 2738) em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$) contendo tetraciclina e incubada por 4,5 horas em agitador com temperatura controlada a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos para titulação posterior.

A cultura foi transferida para um tubo e centrifugada (10 minutos, 10.000 rpm, 4°C), as células residuais descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e centrifugado novamente. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, onde se adicionou 1/6 do volume de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5M) e a mistura permaneceu em repouso *overnight* a 4°C. No dia seguinte, centrifugou-se o precipitado (15 minutos, 10.000 rpm, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o tubo novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores por mais 5 minutos para remoção do sobrenadante residual. O *pellet* de fagos foi ressuspensionado em 1mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado (10 minutos, 10.000 rpm, 4°C) para a retirada das células residuais e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, para adição de PEG-NaCl (1/6 do volume).

Incubou-se a mistura por 1 hora em gelo, com posterior centrifugação (15 minutos, 14.000 rpm, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o tubo centrifugado novamente por mais 5 minutos para retirada do sobrenadante residual, e o *pellet* ressuspensionado em 200 µL de TBS e centrifugado por 1 minuto, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estando pronto para titulação.

Os fagos re-amplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo ($2,0 \times 10^{11}$ pfu) e assim subsequentemente por um total de quatro ciclos, sendo que a partir do terceiro aumentou-se a estrigência do tampão de lavagem de 0,1% para 0,5%, utilizando-se então 0,5% de Tween 20 em todas as lavagens.

Para todas as titulações utilizou-se 1 µL dos fagos, diluídos em 9 µL do meio de cultura LB. As diluições foram 10^1 à 10^6 , para o eluato e eluato amplificado, os fagos, nos títulos conforme descrito anteriormente, foram incubados com 200 µL de *E. coli* (ER 2738) e plaqueados em meio sólido contendo IPTG (0,5mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ / litro).

Após incubação em estufa por toda noite a 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis X fator de diluição).

3.7 - Caracterização dos clones

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β-galactosidase pelo fago, foram re-amplificadas separadamente em microtubos para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, adicionou-se as colônias isoladas a 1mL de meio de cultura contendo *E. coli* (ER 2738) em fase de crescimento inicial e tetraciclina, após incubação *overnight* a 37°C sob agitação vigorosa, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, para retirada do sobrenadante da cultura a ser utilizado para a extração de DNA, e posterior armazenamento do *pellet* juntamente com o mesmo volume de glicerol 50%. Cento e quatorze clones devidamente identificados foram utilizados para os processos de caracterização descritos no item 3.8.

3.8 - Obtenção e sequenciamento do DNA

Para obtenção de DNA dos fagos foram utilizadas as colônias isoladas e crescidas como descrito no item 3.7. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas (10 minutos 10.000 rpm, 4°C), sendo o sobrenadante utilizado para a precipitação com 1/6 do volume de PEG-NaCl (20% polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M) por 10 min a Ta. O material foi, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 100 µL de tampão Iodeto de Sódio (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM e NaI 4M), e a precipitação de ácido nucléico foi realizada com adição de 250 µL de etanol absoluto, este material foi deixado 10 minutos a Ta, centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%, sendo em seguida centrifugado e o *pellet* ressuspensionado em 20 µL de água mili-Q, de acordo com Barbas et al., 2001. A qualidade e quantidade de DNA presente nas amostras foi avaliada por amostragem em gel de agarose 0,8 %.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cyclor* (Pharmacia), 3 µL do DNA obtido e 1 µL de *Primer* -96 gIII (-96 M13 – 5' HO CCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG 3' – Amersham Biosciences), que amplifica a região de aa codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M 13 recombinantes.

A reação de amplificação aconteceu em termociclador (*Eppendorff*). A precipitação do material amplificado se deu acrescentando-se acetato de amônio 4M e etanol absoluto às amostras, seguido de centrifugação por 40 minutos a 14.000 rpm a 4°C e lavagem com etanol 70% com posterior centrifugação por 10 minutos nas condições anteriores. A diluição foi realizada com 10 µL de tampão de corrida apropriado (*Loading buffer*). O sequenciamento se deu utilizando-se o sequenciador automático *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences).

A análise das seqüências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*). Logo após esta pré-análise, as seqüências foram traduzidas.

3.9 - Análise dos dados por bioinformática

As seqüências de DNA geradas pelo sequenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis *on-line*.

Para a tradução das seqüências de aa utilizou-se o programa DNA2PRO12, específico para seqüências de bibliotecas da *New England Biolabs* (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>). Para o cálculo da frequência de cada aminoácido presente nos peptídeos seqüenciados e a diversidade dos mesmos, foi utilizado o programa AAFREQ (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs3.aspx>).

Para calcular a diversidade e a derivação padrão dos aa em cada posição nos peptídeos utilizou-se o programa DIVAA (<http://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>). Foi utilizado o programa MOTIF2 (<http://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>) para a identificação de motivos de três aa dentro a população de peptídeos que foi selecionada contra IgGs de pacientes com NC.

Os motivos protéicos consenso gerados foram analisados quanto à similaridade com proteínas de *T. solium* depositadas no GENE BANK pelo programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para encontrar um ponto máximo de similaridade entre toda a população de peptídeo selecionada e uma proteína de interesse envolvida com NC ou com parasito do gênero *Taenia* em especial *T. solium* e *T. saginata* ou uma proteína encontrada no BLAST por similaridade, utilizou-se o programa MATCH disponível em <http://relic.bio.anl.gov/match.aspx>.

3.10 - Testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados

Após a obtenção das seqüências de DNA dos clones selecionados por sequenciamento e suas análises por bioinformática, foi realizado o teste ELISA com os clones considerados mais relevantes, devido à presença repetida de domínios consenso na população de fagos.

Os clones foram re-amplificados e precipitados com PEG-NaCl, para limpeza do meio de cultura, sendo utilizados os clones NC₂2, NC₂8, NC₂12, NC₂15, NC₂23, NC₃9, NC₃10, NC₃36, NC₄1 e NC₄3 (isolados previamente pelo procedimento de *biopanning*) tendo como controle negativo em cada placa o fago selvagem (M13).

Testes ELISA foram realizados como rastreamento prévio quanto à reatividade dos peptídeos recombinantes (expressos nos fagos selecionados), com os anticorpos presentes no soro de pacientes com NC e está esquematizado na Figura 4. Para isto houve a utilização de um sistema de captura, tendo como antígeno as partículas virais purificados de todos os clones acima mencionados. Os anticorpos utilizados foram provenientes de soro total ou IgG purificada.

Placas de poliestireno (Interlab, Brasil) foram sensibilizadas com cada clone a uma concentração de 1×10^{10} /poço diluídos em 100 μ L de tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* sob agitação à 4°C.

Após três lavagens com PBS acrescido de 0,05% Tween 20 (PBS-T) adicionou-se 300 μ L de tampão de bloqueio PBS-Tween 20 0,05% - leite desnatado 5% (PBST-M), sendo a placa incubada por mais 1 hora a 37°C, e em seguida lavada 6 vezes. Após as lavagens as amostras de soro foram adicionadas, diluídas 1:200 em PBST-M pré incubado com partículas virais de fago M13 (selvagem), sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C.

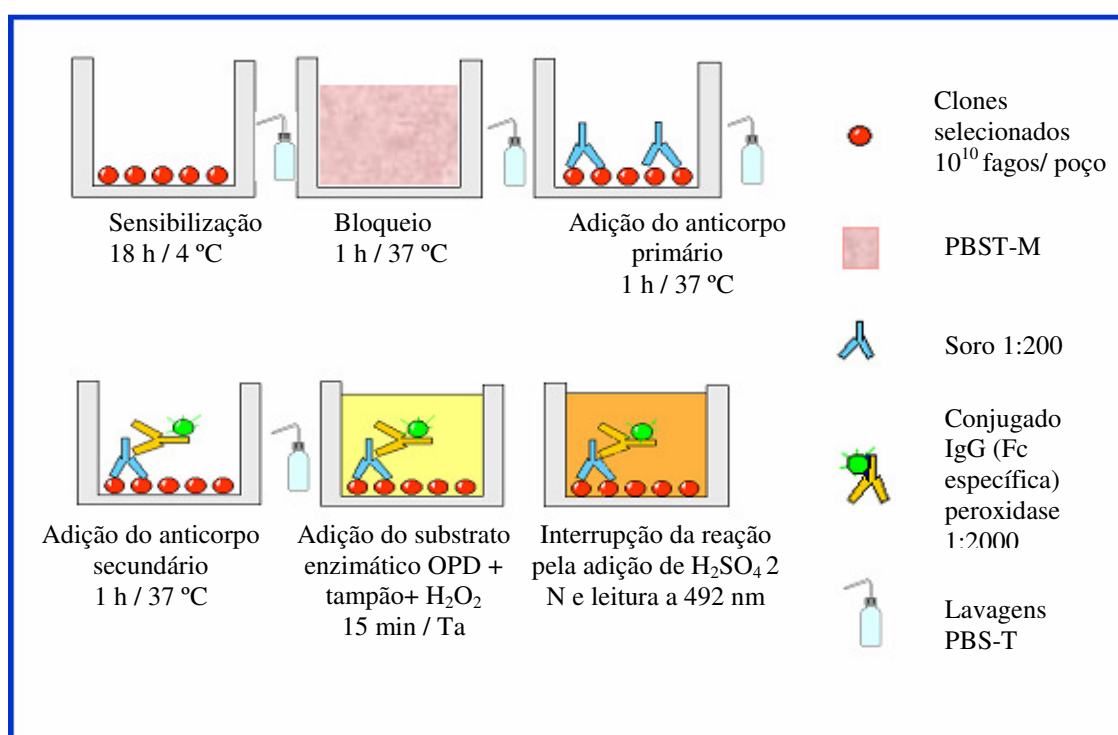


Figura 4 - Esquema do ensaio imunoenzimático ELISA para determinação dos níveis de IgG específica frente aos clones selecionados.

Lavou-se a placa mais 6 vezes para adição do anticorpo conjugado, anti-IgG humana (IgG, Fc HRP – USBiological), diluídos 1:2000 em PBST-M, com incubação a 37°C por 1 hora. Após as lavagens revelou-se a reação utilizando-se OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloroide – Sigma), num volume final de 100 μ L de tampão apropriado contendo H₂O₂ e interrompida pela adição de 25 μ L de H₂ SO₄ 2 N. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus Versão 2.03, com filtro de 492 nm.

Experimentos de inibição (ELISA de competição) foram realizados da mesma forma que o teste ELISA, exceto pela sensibilização da placa com antígeno total de metacéstódeos

de *T. solium* e pré-incubação do soro com os clones de fago ou fago selvagem previamente à sua incubação na placa, logo após o bloqueio. Concentrações variadas de cada fago foram adicionadas na ordem de 10^4 - 10^{10} .

O Índice ELISA (IE) foi calculado utilizando-se a média das três amostras negativas contendo o fago selvagem (fago sem peptídeo recombinante). (IE = densidade ótica de cada amostra/ *cut off* do selvagem = média + 2 desvios padrão). As amostras com IE >1 foram consideradas positivas.

3.11 - Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.12 – Análise estatística

A sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e o Índice de Youden (IY) foram determinados de acordo com Mineo et al., (2005).

Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Eficiência do diagnóstico (\%)} = \text{Acurácia} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

$$\text{IY} = (\text{sensibilidade}) + (\text{especificidade}) - 1 \quad \text{ou} \quad \text{IY} = \left(\frac{a}{a + c} + \frac{d}{b + d} \right) - 1$$

Onde:

a = verdadeiros positivos no teste

b = falso positivos no teste

c = falso negativos no teste

d = verdadeiros negativos no teste

a + c = pacientes com NC

b + d = pacientes do grupo 2 e indivíduos do grupo 3

A média geométrica (mg) dos valores do Índice de Reatividade (IR) para cada fago em cada grupo foi calculada utilizando o programa *GraphPad Prism* Versão 4.0 - *Windows software*.

A análise comparativa entre os fagos e entre os grupos no ELISA foi realizada através do programa de Bioestat versão 2.0, utilizando o teste de diferença entre duas proporções. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 - RESULTADOS

4.1 – Purificação de imunoglobulinas por *beads* magnéticos

A purificação dos anticorpos do *pool* de soros de pacientes positivos para NC, com outras parasitoses e aparentemente saudáveis pelos *beads* magnéticos se mostrou eficiente. A quantidade de anticorpos purificada se encontra na Tabela 1. A Figura 5 demonstra a membrana de nitrocelulose contendo as amostras de imunoglobulinas após a confirmação da purificação pela técnica de *Dot Blot*.

Tabela 1: Absorbância e quantificação dos anticorpos obtidos após purificação.

Amostra	Absorbância (280 nm)	Quantificação (mg/ mL)
Neurocisticercose	0,015	1,10
Outras Parasitoses	0,019	1,40
Indivíduos Saudáveis	0,014	1,03

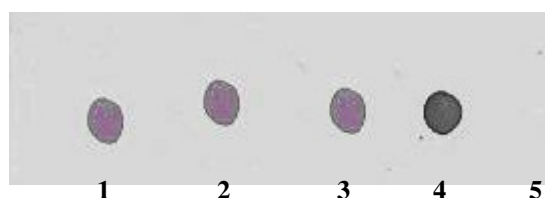


Figura 5 - Membrana de *Dot Blot* das amostras de IgG purificadas a partir do *pool* de soros de pacientes positivos para NC (1), outras parasitoses (2), indivíduos aparentemente saudáveis (3), controle positivo da reação (4), e controle negativo (BSA 5%) após coloração com NBT/BCIP.

Pela concentração obtida através de espectrofotometria das IgGs purificadas, verificou-se que a purificação ocorreu de maneira satisfatória e eficiente. O resultado do ensaio *Dot Blot*, confirmou a presença de IgGs nos *pools* de soros, mostrando que havia IgGs no soro antes da purificação. Por este ensaio também pôde-se verificar que a purificação das IgGs foi bem sucedida, mostrando uma marcação de imunoglobulinas nas amostras de IgGs purificadas semelhante aos *pools* de soro. O teste de *dot blot* mostrou-se específico para IgGs, uma vez que não houve qualquer marcação no controle BSA 5%.

4.2 – *Biopanning* e titulações

Os peptídeos que se ligaram às IgGs de indivíduos controles e outras parasitoses foram pré selecionados negativamente, de modo que, quando houve a seleção dos peptídeos pelas IgGs de indivíduos com NC, essa foi realizada com alta especificidade.

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos, as colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-gal, e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, como mostrado na Figura 6. Pelo processo de *biopanning* foi possível aumentar a especificidade dos peptídeos selecionados contra o alvo, no caso, proteínas do extrato total de metacestódeos de *T. solium*.

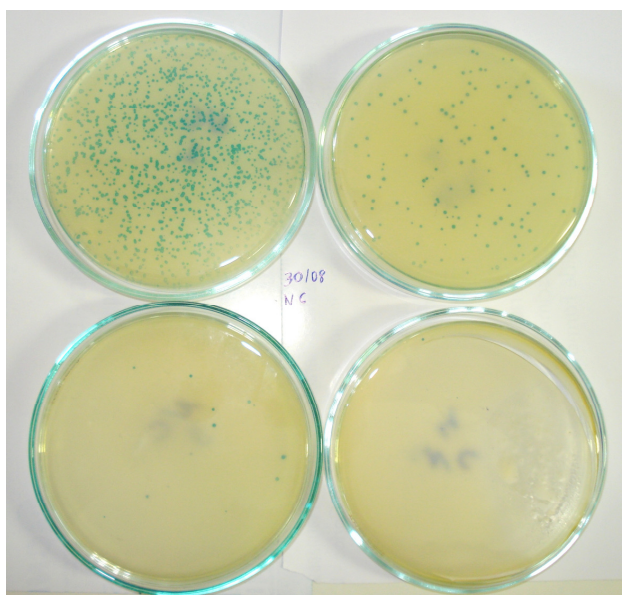


Figura 6 - Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com os fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase.

Foram utilizadas as placas cujas colônias estavam mais espaçadas e com isso poderiam ser mais facilmente contadas. Após a contagem e multiplicação pelo devido fator de diluição, foram obtidos os títulos de entrada e saída em cada ciclo.

Os títulos de entrada e saída obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 2, que demonstra enriquecimento dos clones a favor do alvo durante os ciclos de seleção.

Tabela 2 - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais anti-NC. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.

Ciclo / Estringência	Seleção para NC	
	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
Primeiro / 0,01% tween	$2,0 \times 10^{11}$	$1,51 \times 10^4$
Segundo / 0,01% tween	$2,0 \times 10^{11}$	$1,35 \times 10^5$
Terceiro / 0,05% tween	$2,0 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^4$
Quarto / 0,05% tween	$2,0 \times 10^{11}$	$2,64 \times 10^5$

4.3 – Extração de DNA dos fagos

Após o crescimento individual 114 colônias extraídas da placa de titulação do 2° (NC₂), 3° (NC₃) e 4° (NC₄) ciclos de seleção, foi extraído o DNA de cada clone. Após o processo de seleção biológica, os clones selecionados foram caracterizados por seqüenciamento de DNA da região correspondente ao inserto dos peptídeos recombinantes. Foram escolhidos randomicamente 10 DNAs para se verificar a qualidade através da visualização por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (Figura 7). A quantidade de DNA também pôde ser verificada por essa eletroforese comparando a banda obtida em cada fago com a banda padrão do controle, este procedimento demonstrou quantidade suficiente para a realização da reação de sequenciamento.

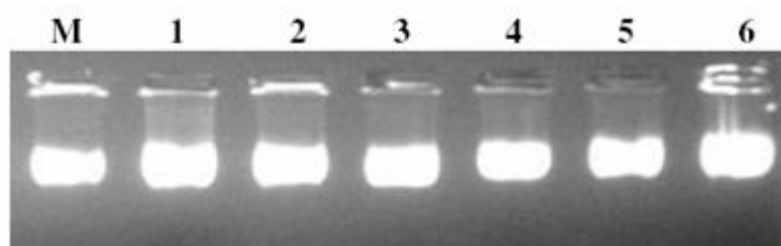


Figura 7 - Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, contendo: M: DNA de fago M13 padrão 400 ng (GE). 1-6: Amostras do DNA dos clones selecionados no *Biopanning*.

4.4 – Sequenciamento

De um total de 114 seqüências, 33 foram inválidas e 81 íntegras destas, 10 distintas entre si. O clone NC₄₁ repetiu-se por 72 vezes e as demais apenas uma vez. A Tabela 3

mostra as seqüências de aa selecionadas no segundo, terceiro e quarto ciclo de seleção juntamente com a freqüência de cada um deles.

Tabela 3: Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos expressos nos fagos.

Peptídeo recombinante selecionado	Freqüência
NC ₄ 1	72/81
NC ₂ 2	1/81
NC ₂ 8	1/81
NC ₂ 12	1/81
NC ₂ 15	1/81
NC ₂ 23	1/81
NC ₃ 10	1/81
NC ₃ 15	1/81
NC ₃ 36	1/81
NC ₄ 3	1/81

4.5 - Análise por Bioinformática

Existem diversos parâmetros que indicam o sucesso de seleção de cada peptídeo. Na Tabela 4 são apresentados os seguintes parâmetros: seqüências de aa obtidas, freqüência dos peptídeos selecionados, freqüência esperada desses peptídeos na biblioteca original, amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada dos peptídeos da biblioteca original, grau de informação de cada peptídeo e número provável de clones independentes dentro da biblioteca.

Observou-se, ainda, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação as suas freqüências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que são específicos para NC.

O cálculo da freqüência total de cada aa e em cada posição dos peptídeos seqüenciados foi realizado pelo programa AAFREQ. A caracterização dos peptídeos obtidos foi realizada por análises de *in silico* (Tabela 5). Neste estudo, foram analisados 10 peptídeos, com extensões de 12 aa por peptídeo. Os aa mais frequentes foram: em primeiro Prolina (P) com freqüência de 0,1167; segundo Alanina (A), Aspartato (D), Histidina (H), Treonina (T) e Triptofano (W) com 0,0833; seguidos de Leucina (L) e Asparagina (N) com 0,0750.

Tabela 4: Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Peptídeos	Frequência observada (FO)	Probabilidade da frequência randômica (FE)*	Amplificação** (FO/FE)	I(m)***	λ****
NC ₂ 2	0.010	$1,37 \times 10^{-14}$	$7,3 \times 10^{10}$	31.92	0.00003
NC ₂ 8	0.010	$9,3 \times 10^{-15}$	1×10^{12}	32.31	0.00002
NC ₂ 12	0.010	4×10^{-17}	$2,4 \times 10^{13}$	37.75	0.00000008
NC ₂ 15	0.010	$1,4 \times 10^{-13}$	$7,2 \times 10^9$	29.61	0.0003
NC ₂ 23	0.010	$1,5 \times 10^{-15}$	$6,7 \times 10^{11}$	34.14	0.000003
NC ₃ 10	0.010	$9,5 \times 10^{-15}$	1×10^{12}	32.28	0.00002
NC ₃ 15	0.010	$8,8 \times 10^{-14}$	$1,1 \times 10^{10}$	30.06	0.0002
NC ₃ 36	0.010	2×10^{-12}	$4,9 \times 10^8$	26.92	0.004
NC ₄ 1	0.89	$5,4 \times 10^{-11}$	$1,6 \times 10^9$	23.63	0,2
NC ₄ 3	0.010	$4,5 \times 10^{-13}$	$2,1 \times 10^9$	28.41	0.0009

*Probabilidade de sequência randômica = frequência esperada na biblioteca (FE) **Amplificação= frequência observada/frequência esperada ***I(m) = grau de informação = $-\ln$ (probabilidade de sequência randômica) **** λ = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ($2,7 \times 10^9$ - Ph.D.-12).

Tabela 5. Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos por posição e total realizado pelo AAFREQ.

aa	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	Total	Frequência
A	1	1	0	1	2	0	0	0	3	1	0	1	10	0,0833
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0000
D	0	1	2	0	1	1	0	2	1	0	1	1	10	0,0833
E	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3	0,0250
F	0	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	6	0,0500
G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0,0167
H	4	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	10	0,0833
I	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	4	0,0333
K	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3	6	0,0500
L	1	1	2	1	0	1	2	0	0	1	0	0	9	0,0750
M	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0,0250
N	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	2	0	9	0,0750
P	0	1	1	0	0	3	3	0	2	2	2	0	14	0,1167
Q	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0083
R	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	4	0,0333
S	1	0	0	1	0	1	0	1	0	2	1	1	8	0,0667
T	1	1	1	2	1	1	1	0	0	0	2	0	10	0,0833
V	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	4	0,0333
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,0833
Y	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6	0,0500
Total aa													120	

A Tabela 6 apresenta a comparação entre a frequência dos vinte aa presentes nos peptídeos ligantes e a frequência esperada destes na biblioteca original.

Pôde ser observado que, realmente houve uma seleção eficiente, pelo fato dos aa Cisteína, Glutamato, Glicina, Leucina, Metionina, Arginina, Serina e Valina terem frequência observada menor que a frequência esperada, sendo assim selecionados negativamente (frequência 0%; 2,5%; 1,7%; 7,5%; 2,5%; 3,3%; 6,7% e 3,3% respectivamente).

Os aa Prolina foi o mais freqüente entre os aa selecionados (11,67%), seguido por Alanina, Aspartato, Histidina, Glutamina, Treonina e Triptofano (8,3%) sendo suas freqüências maiores do que o esperado mostrando uma seleção positiva em relação a estes.

Tabela 6. Freqüência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgG e a freqüência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ.

Aminoácidos		Freqüência	
		Esperada (%)	Observada (%)
A (Alanina)	Ala	6,2	8,3
C (Cisteína)	Cis	3,1	0
D (Aspartato)	Asp	3,1	8,3
E (Glutamato)	Glu	3,1	2,5
F (Fenilalanina)	Fen	3,1	5
G (Glicina)	Gly	6,2	1,7
H (Histidina)	His	3,1	8,3
I (Isoleucina)	Ile	3,1	3,3
K (Lisina)	Lys	3,1	5,0
L (Leucina)	Leu	9,4	7,5
M (Metionina)	Met	3,1	2,5
N (Asparagina)	Asn	3,1	7,5
P (Prolina)	Pro	6,2	11,67
Q (Glutamina)	Gln	6,2	8,3
R (Arginina)	Arg	9,4	3,3
S (Serina)	Ser	9,4	6,7
T (Treonina)	Thr	6,2	8,3
V (Valina)	Val	6,2	3,3
W (Triptofano)	Trp	3,1	8,3
Y (Tirosina)	Tyr	3,1	5,0

As regiões de menor diversidade são as que apresentam maior frequência dos aa selecionados positivamente (Prolina, Alanina, Aspartato, Histidina, Glutamina, Treonina e Triptofano). A Prolina foi selecionada principalmente para as posições 6 e 7 dos peptídeos.

A Figura 8 apresenta um gráfico realizado pelo programa DIVAA que calcula a diversidade de aa em cada uma das 12 posições nos peptídeos, mostrando as posições onde ocorreu a maior e menor diversidade de aa.

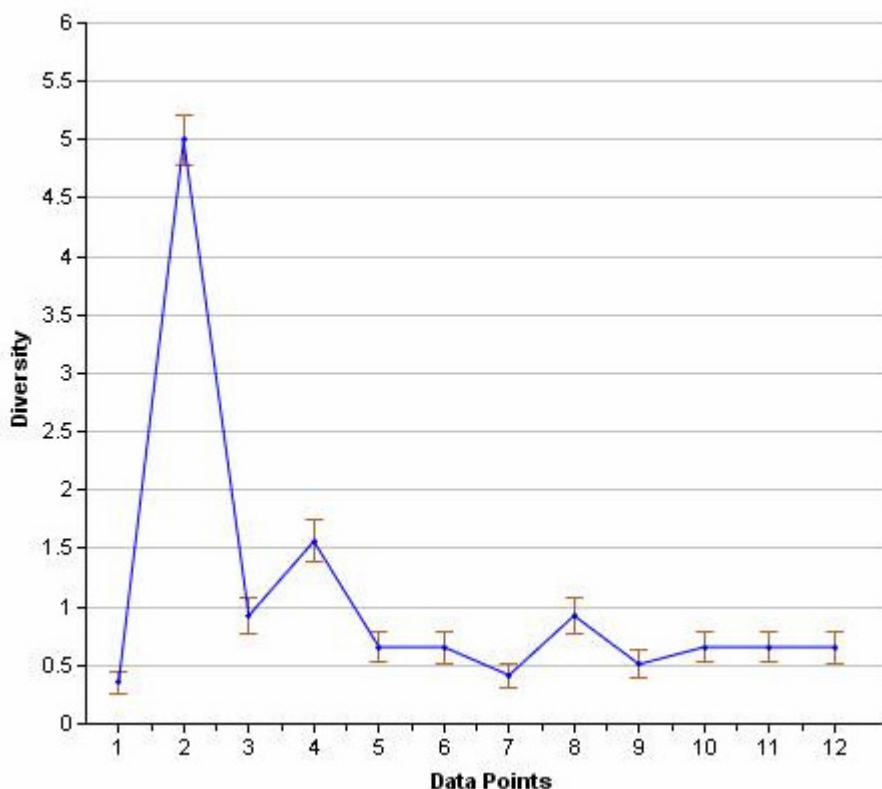


Figura 8 - Gráfico construído pelo programa DIVAA que ilustra a diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

Observa-se que as posições de maior diversidade de aa são a 2, 4 e 8, e as posições de menor diversidade são a 1, 3, 5, 7 e 9. As regiões de menor diversidade são as que apresentam maior frequência dos aa selecionados positivamente (Prolina, Alanina, Aspartato, Histidina e Glutamina).

Foi realizada a busca por seqüências consenso de 3 aa através do programa MOTIF2. A Tabela 7 demonstra os principais motivos encontrados:

Tabela 7. Sequências consenso encontradas através do programa MOTIF2 entre os peptídeos selecionados.

Sequências consenso	Peptídeos alinhados
fdxxn	fdhwn fdaan fdnrn fdpen
axdxxn	apfdxxn adfdxxn
axfd	apfd adfd
axfxxxn	apfxxxn adfxxxn
dxxnd	dhwnd dnrnd
fdxxxd	fdxxxd fdxxxd
fxxnd	fxxnd fxxnd
hxlxxp	hxlxxp hxlxxp
hxxxxpxxa	hxxxxpsa hxxxxpda
hxxxxpf	hxxxxpf yhxxxxpf
htl	htl xxxxhtl
htxxp	htxxp htxxp
lxxxxhxxd	lxxxxhxxd lxxxxhxxd
pxdxxn	pdfxxn pdfxxn
pdf	xxxpdfxxx xxxpdfxxx
pfxxxn	xxxpfxxxnd xxxpfxxxnk
sas	xxxxsasxx xsasxxx
txdxxn	txdxxnx txdxxnxx
txfd	tpfd tafd
txfxxxn	tpfxxxn tafxxxn
tlxxp	tlkyp tlmpp
txxxpe	txxxpe txxxpe
txxsxs	tsasgs tlysas

Pelo programa CLUSTAL W obteve-se o pareamento dos peptídeos selecionados. Não foram observados motivos.

Os peptídeos apresentaram similaridade com algumas proteínas de diversas espécies do gênero *Taenia*, dentre elas as mais importantes e freqüentes: *T. solium* e *T. saginata*, que estão presentes no banco de dados. A Tabela 8 apresenta as principais proteínas relacionadas às espécies de *T. solium* e *T. saginata* citadas anteriormente que obtiveram similaridade com os clones selecionados.

Tabela 8. Similaridade das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados com proteínas anotadas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST, com os números de acesso.

Peptídeo	Potenciais antígenos	Acesso Banco
NC ₂ 2	1) Proteína ligante de cálcio precursora de calreticulina [<i>T. solium</i>]	1) gblAAK52725.1 AF340232_1
	2) ATP sintase F0 subunidade 6 [<i>T. solium</i>]	2) ref NP_659229.1
	3) ATPase subunidade 6 [<i>T. saginata</i>]	3) dbj BAC98841.1
	4) c-jun [<i>T. solium</i>]	4) gblAAS88553.1
	5) Citocromo C subunidade 1 [<i>T. solium</i>]	5) dbj BAE53694.1
NC ₂ 8	1) Proteína de oncosfera ativada TSO45-2A [<i>T. solium</i>]	1) dbj BAC98841.1
	2) TSO45-B9 [<i>T. solium</i>]	2) gblAAM88226.1 AF523868_1
	3) TSO45- B10 [<i>T. solium</i>]	3) gblAAM88221.1 AF523830_1
	4) TSO45-B3 [<i>T. solium</i>]	4) gblAAM88229.1 AF523871_1
	5) TSO45-B2 [<i>T. solium</i>]	5) gblAAM88228.1 AF523870_1
	6) TSO45-A2 [<i>T. solium</i>]	6) gblAAM88223.1 AF523865_1
	7) TSO45-A3 [<i>T. solium</i>]	7) gblAAM88217.1 AF523826_1
NC ₂ 12	1) anexina B2 [<i>T. solium</i>]	1) gblAAY17503.1
	2) Ts3 protein	2) gblABY56687.1
	3) Antígeno diagnóstico GP50 [<i>T. solium</i>]	3) gblAAP49284.1
	4) Antígeno diagnóstico precursor GP50c [<i>T. solium</i>]	4) gblAAP49288.1
	5) Antígeno diagnóstico Antígeno diagnóstico GP50 b [<i>T. solium</i>]	5) gblAAP49287.1
NC ₂ 15	1) Paramiosina [<i>T. solium</i>]	1) gblAAT94289.1

	2) c-jun [<i>T. solium</i>]	2) gblAAS88553.1
NC ₂₃	1) Citocromo C subunidade III [<i>T. saginata</i>]	1) ref YP_001527634.1
	2) Citocromo C subunidade III [<i>T. solium</i>]	2) gblAAK52959.1 AF367053_1
	3) Proteína de oncosfera Tso31 [<i>T. solium</i>]	3) gblABH07376.1
	4) NADH desidrogenase subunidade 5 [<i>T. saginata</i>]	4) ref YP_001527645.1
NC ₃₁₀	1) TGTP1 [<i>T. solium</i>]	1) gblAAB05911.1
	2) Proteína de oncosfera Tso22b [<i>T. solium</i>]	2) gblAAW88552.1
NC ₃₁₅	1) Proteína diagnóstica TSES38 [<i>T. solium</i>]	1) gblAAM96903.1
	2) c-jun [<i>T. solium</i>]	2) gblAAS88553.1
	3) Glicoproteína TSO45W-4B [<i>T. solium</i>]	3) gblAAQ83444.1
	4) TSO45W-4B [<i>T. solium</i>]	4) gblAAM88221.1 AF523830_1
	5) Paramiosina [<i>T. solium</i>]	5) gblAAT94289.1
NC ₃₃₆	1) ATPase transportadora de Sódio/Potássio subunidade alfa (TNaK1-alpha)	1) splQ6RWA9 AT1A_TAESO
	2) Antígeno de baixo peso molecular variante 1 [<i>T. solium</i>]	2) dbj BAE96729.1
	3) Glicoproteína de 8 kDa precursora de TS18 [<i>T. solium</i>]	3) gblAAD51768.1 AF098074_1
	4) Antígeno diagnóstico 8 kDa Ts18 variante 1 [<i>T. solium</i>]	4) gblAAM00199.1 AF356330_1
	5) Proteína ligante de cálcio precursora de calreticulina [<i>T. solium</i>]	5) gblAAK52725.1 AF340232_1
NC ₄₁	1) NADH desidrogenase subunidade I [<i>T. solium</i>]	1) emb CAB77253.1
	2) Citocromo C oxidase subunidade III [<i>T. solium</i>]	2) gblAAK52959.1 AF367053_1
	3) ATPase subunidade 6 [<i>T. saginata</i>]	3) dbj BAC98841.1
	4) Anexina [<i>T. solium</i>]	4) gblAAF64166.1 AF239799_1
	5) Glutathione S Transferase [<i>T. solium</i>]	5) gblAAM64045.1 AF403222_1
NC ₄₃	1) c-fos [<i>T. solium</i>]	1) gblAAS88555.1
	2) NADH desidrogenase subunidade 5 [<i>T. saginata</i>]	2) ref YP_001527645.1
	3) Proteína Ts3 [<i>Taenia solium</i>]	3) gblABY56687.1

Para análise da região de similaridade máxima das proteínas associadas ao parasito com os clones selecionados, foi utilizado o programa MATCH. A Tabela 9 apresenta as regiões de similaridade das principais proteínas com mais de um clone.

Em ordem seqüencial, foram determinados os peptídeos, a posição do alinhamento do peptídeo com o motivo protéico e o nome da proteína. O alinhamento revelou similaridades dos motivos com várias proteínas antigênicas e ainda, proteínas com funções celulares importantes.

Tabela 9 - Alinhamento das regiões de similaridade das seqüências peptídicas com as principais proteínas do parasito encontradas.

Proteína	Peptídeo	Região de Similaridade na proteína
Proteína ligante de cálcio precursora de calreticulina [<i>Taenia solium</i>]	NC ₂	Maximum similarity is 55.672 at position 127 ↓ Maximum similarity position= 127 ktaetgslvadfdmipprtiddpdakkpedwvd 150
ATP sintase FO subunidade 6 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₂ 8	Maximum similarity is 22.126 at position 13 ↓ Maximum similarity position= 13 ricdnvniffsslipvgtpiyicplvcvaesisyiirpvlilrpfi
ATPase subunidade 6 [<i>Taenia saginata</i>]	NC ₄ 3	Maximum similarity is 23.328 at position 13 ↓ Maximum similarity position= 13 rvfdnvniffssfipvgtpiyicplvciaelisyiirpvlilrpfi
Proteína de oncosfera ativada TSO45-2A [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 47.202 at position 162 ↓ Maximum similarity position= 162 tghggvtvvttsgsgiasailgllftctvlvla

TSO45-B9 / B10 /B3 e B2 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 47.202 at position <u>61</u>
		↓ Maximum similarity position= 61 ghggvtvvtts^{ts}sgsgiasailgllftctvlvla
TSO45-A2 e A3 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 47.202 at position <u>162</u>
		↓ Maximum similarity position= 162 tchggqvtvvtts^{ts}sgsgiasailgllftctvlvla
Anexina B2 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₂ 12	Maximum similarity is 22.126 at position <u>42</u>
		Maximum similarity position= 42 ykkkygrelahdldgdldkghfrdctilltedpiylmakslyy^{yy}amkgvgtn
Proteína Ts3 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 10	Maximum similarity is 52.207 at position <u>86</u>
	NC ₃ 15	Maximum similarity position= 86 atsfqvikvevipdqkccrrphitqfhdkn^{lk}fp^{lp}hrvnr^{lr}lhapr:
Antígeno diagnóstico GP50 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 46.681 at position <u>177</u>
	NC ₂ 2	↓ Maximum similarity position= 177 tmpayatktstrnn^{sk}ttssg^{sg}pasmtcraiaa 200

Antígeno diagnóstico precursor GP50c e GP50 b [<i>Taenia solium</i>]	NC ₂ 8	Maximum similarity is 21.708 at position <u>125</u> ↓ Maximum similarity position= 125 efctdmvkdesadlr¹²⁵vfrg¹²⁶vfprktnisresfafag 150
Paramiosina [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 36	↓ Maximum similarity position= 475 ksdmsrlkkkyeatis⁴⁷⁵el⁴⁷⁶vql⁴⁷⁷d⁴⁷⁸van⁴⁷⁹k⁴⁸⁰ananlnresktlaqrvqelqaal 500
c-jun [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 68.910 at position <u>63</u> ↓ Maximum similarity position= 63 sklgia⁶³re⁶⁴pt⁶⁵nv⁶⁶sa⁶⁷sg⁶⁸vltlrslertgeegsggstavwsarsltnfvt
Citocromo C oxidase subunidade III [<i>Taenia solium</i>]	NC ₂ 8 NC ₂ 23	Maximum similarity is 57.298 at position <u>36</u> Maximum similarity position= 36 ↓ lmgc³⁶lffds³⁷wsyesl³⁸ss³⁹sl⁴⁰eipfv⁴¹gc⁴²fv⁴³llg⁴⁴ssi⁴⁵vt⁴⁶af⁴⁷hhllgwkccdf ↓ Maximum similarity position= 380 lsnlm³⁸⁰snw³⁸¹ss³⁸²sl³⁸³fgcdnlvelcytkfyhm 400
NADH desidrogenase subunidade 5 [<i>Taenia saginata</i>]	NC ₂ 8	

TGTP1 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₄ 1	Maximum similarity is 24.464 at position <u>293</u> Maximum similarity position= 293 llekagrtrtlllwp slvvailllllvifvni anyggvvnktpfvlvsa Maximum similarity is 47.202 at position <u>61</u>
Glicoproteína TSO45W-4B [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity position= 61 ghggvtvvctsgsciasailgllltctvlvpa
ATPase transportadora de Sódio/Potássio subunidade alfa (TNaK1-alpha)	NC ₂ 8 NC ₃ 10	Maximum similarity position= 393 nraefkpgeetnpvlkrengdase sal l kcvgl siggvtyntdkpkva
NADH desidrogenase subunidade 1 [<i>Taenia solium</i>]	NC ₄ 1 NC ₃ 36	Maximum similarity is 103.062 at position <u>92</u> Maximum similarity position= 92 talcy csynlvdfm sgwlsfiifpcilviylicilcethrt pfdygeae
c-fos [<i>Taenia solium</i>]	NC ₃ 15	Maximum similarity is 22.512 at position <u>126</u> Maximum similarity position= 126 yrspaqsvlp glssaeggeaegkwlrsgvclfyteapk 150
NADH desidrogenase subunidade 5 [<i>Taenia saginata</i>]	NC ₂ 8	Maximum similarity position= 380 dsnlm enwssslfgcdnlvelcytkfyhm 400

4.6 – Testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados

Os níveis de IgG sérica anti-metacestódeo de *T. solium* determinados por ELISA e as porcentagens de positivities, utilizando cada fago são demonstrados nas Figuras 10a-10c.

Para o clone NC₂2 80% (32/40) das amostras foram positivas para o grupo 1, 2,5% (1/40) no grupo 2 e 5 % (2/40) no grupo 3. Para o clone NC₂8 52,5% (21/40) das amostras foram positivas no grupo 1 e nenhuma (0/40) para os grupos 2 e 3. Para o clone NC₂12 foram positivas 95% (38/40) das amostras no grupo 1 e respectivamente 5% (2/40) e 7,5% (3/40) nos grupos 2 e 3. Quando se testou o clone NC₂15 97,5% (39/40) das amostras do grupo 1 foram positivas, 15% (6/40) e 10% (4/40) para os grupos 2 e 3, respectivamente. Com o clone NC₂23 foi observada positividade de 97,5% (39/40) no grupo 1 e nos grupos 2 e 3 17,5% (7/40) e 10% (4/40), respectivamente. Para o clone NC₃10 o grupo 1 apresentou 70% (28/40) de amostras positivas no grupo 1 e nos grupos 2 e 3, respectivamente, 5% (2/40) e 10% (4/40). A positividade para o clone NC₃15 no grupo 1 foi 65% (26/40), nenhuma amostra do grupo 2 foi positiva e no grupo 3 a positividade foi de 7,5% (3/40). Quando se testou o clone NC₃36 82,5% (33/40) das amostras foram positivas para o grupo 1 e respectivamente, 25% (10/40) e 2,5% (1/40) nos grupos 2 e 3. Enquanto que para o clone NC₄1 observou-se uma positividade de 100% (40/40) no grupo 1, 10% (4/40) no grupo 2 e 5% (2/40) no grupo 3. Já para o clone NC₄3 97,5% (39/40) das amostras do grupo 1 foram positivas e 7,5% (3/40) nos grupos 2 e 3. Os resultados demonstram que os peptídeos foram específicos para o alvo utilizado na seleção. A maioria dos clones apresentou reatividade, embora com perfis diferenciados entre os fagos. Pela metodologia foi possível confirmar a especificidade da seleção em função da maioria dos clones apresentarem positividade no grupo 1 (índice de reatividade-IR > 1).

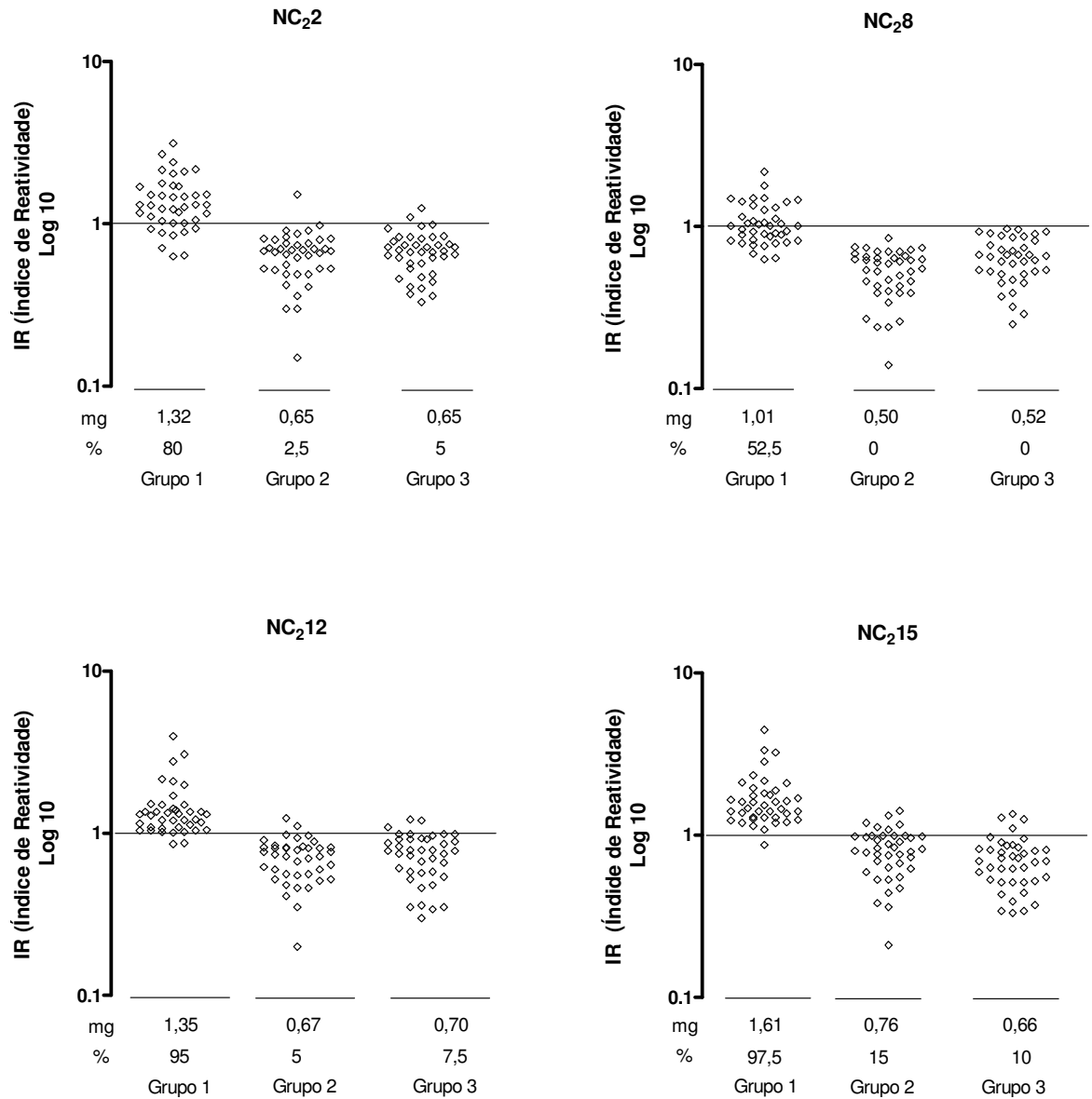


Figura 9 a. Níveis de IgG sérica obtidos por ELISA frente aos clones NC₂₂, NC₂₈, NC₂₁₂ e NC₂₁₅, obtidos pelo processo de *biopanning*. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (n=40) e 3- indivíduos saudáveis (n=40) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1; mg: média geométrica, % = positividade.

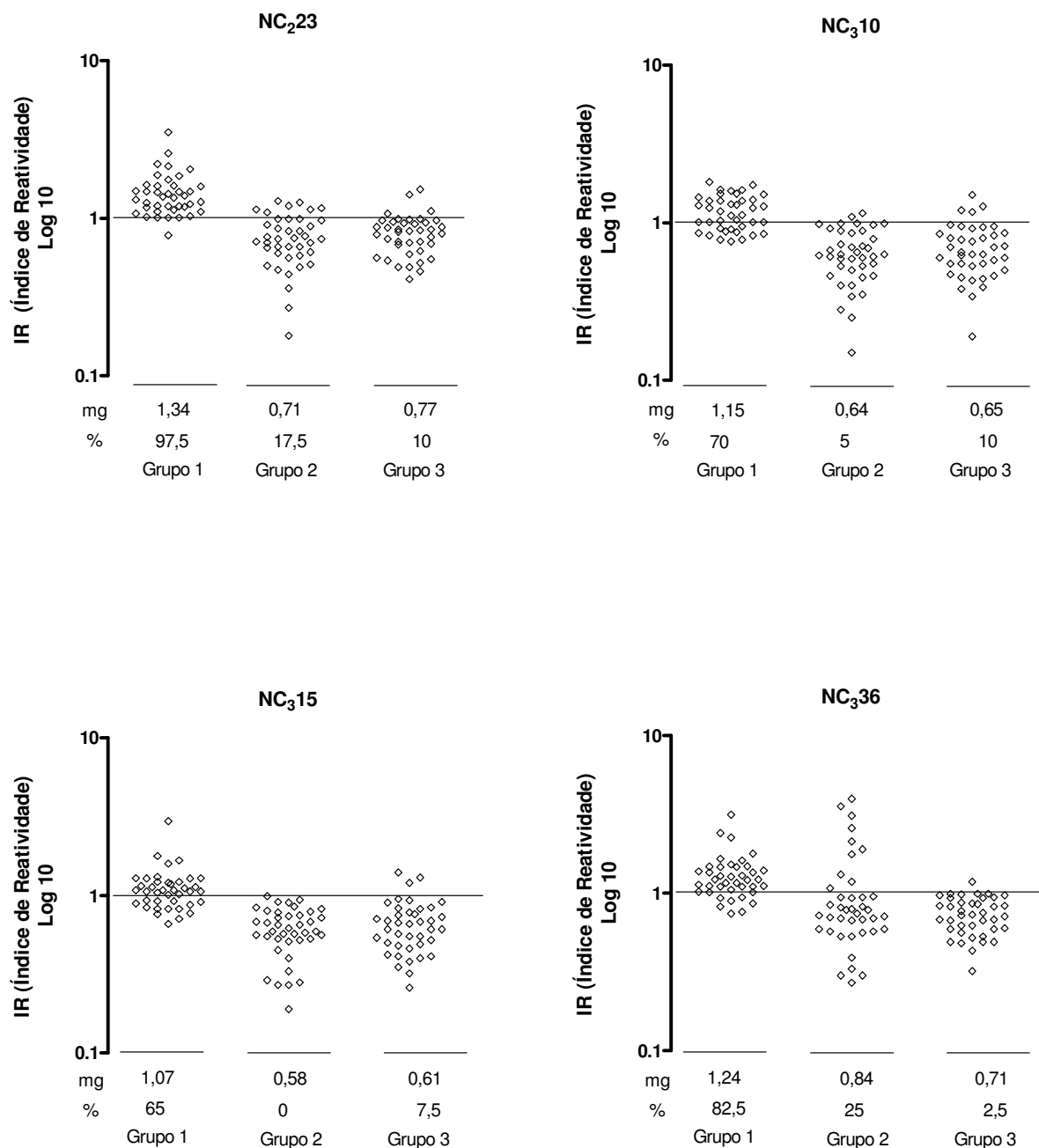


Figura 9 b. Níveis de IgG sérica obtidos por ELISA frente aos clones NC₂₂₃, NC₃₁₀, NC₃₁₅ e NC₃₃₆, obtidos pelo processo de *biopanning*. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (n=40) e 3- indivíduos saudáveis (n=40) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1; mg: média geométrica, % = positividade.

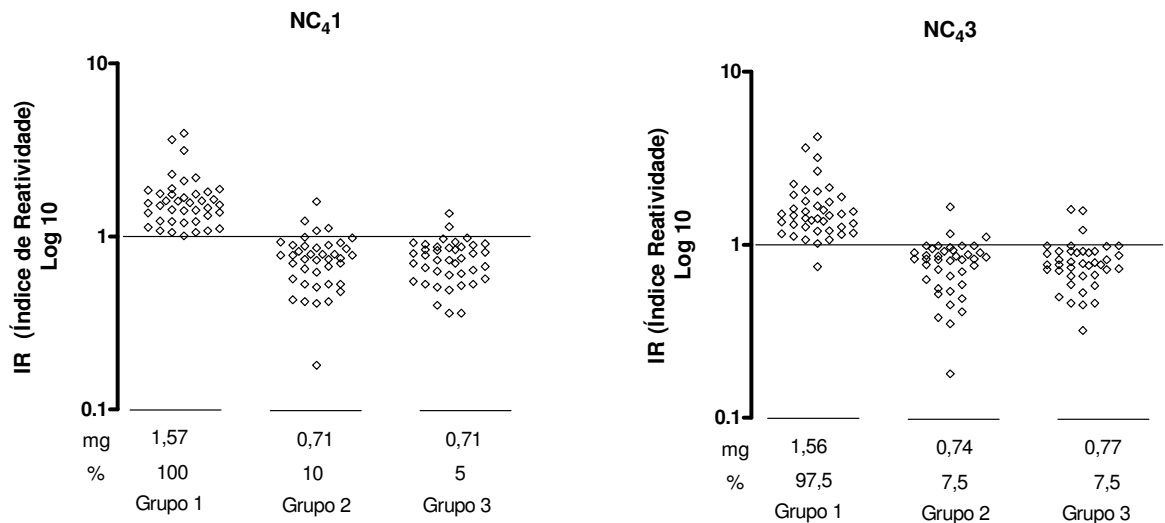


Figura 9 c. Níveis de IgG sérica obtidos por ELISA frente aos clones NC₄₁ e NC₄₃, obtidos pelo processo de *biopanning*. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (n=40) e 3- indivíduos saudáveis (n=40) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1; mg: média geométrica, % = positividade.

Para detectar pacientes do grupo 1 o clone NC₂₁₂ foi significativamente melhor que NC₂₂, NC₂₈, NC₃₁₀, NC₃₁₅ e NC₃₃₆ ($p= 0,0213$; $p= 0,0001$; $p=0,0016$; $p=0,0004$ e $p=0,0384$; respectivamente) e similar a NC₂₂₃, NC₄₁ e NC₄₃ ($p= 0,2781$; $p=0,0760$ e $p=0,2781$). O mesmo foi observado para os clones NC₂₁₅, NC₂₂₃, NC₄₁ e NC₄₃, que foram significativamente melhores que NC₂₂, NC₂₈, NC₃₁₀, NC₃₁₅ e NC₃₃₆ ($p<0,01$) e semelhantes entre si ($p>0,05$).

No teste de competição os clones expressando o peptídeo inibiram a ligação das IgG do soro ao antígeno total de maneira dose dependente (Figura 11). Ao contrário nenhuma inibição foi observada com a adição do fago selvagem. Os dados demonstraram que quantidades crescentes dos clones de fago ao soro interfere a ligação das IgG no momento do reconhecimento do antígeno na placa. O controle negativo utilizado foi vetor sem inserto, representado pelo fago selvagem M13KE e o controle positivo, foi demonstrado pela adição do *pool* de soros de pacientes com NC sem adição dos clones. Estes dados indicam que os peptídeos expressos nos clones de fagos podem ser reconhecidos especificamente pelas IgG presentes no soro de pacientes com NC e estes peptídeos apresentam capacidade de mimetizar os epítomos presentes nas proteínas totais de metacestódeos de *T. solium*.

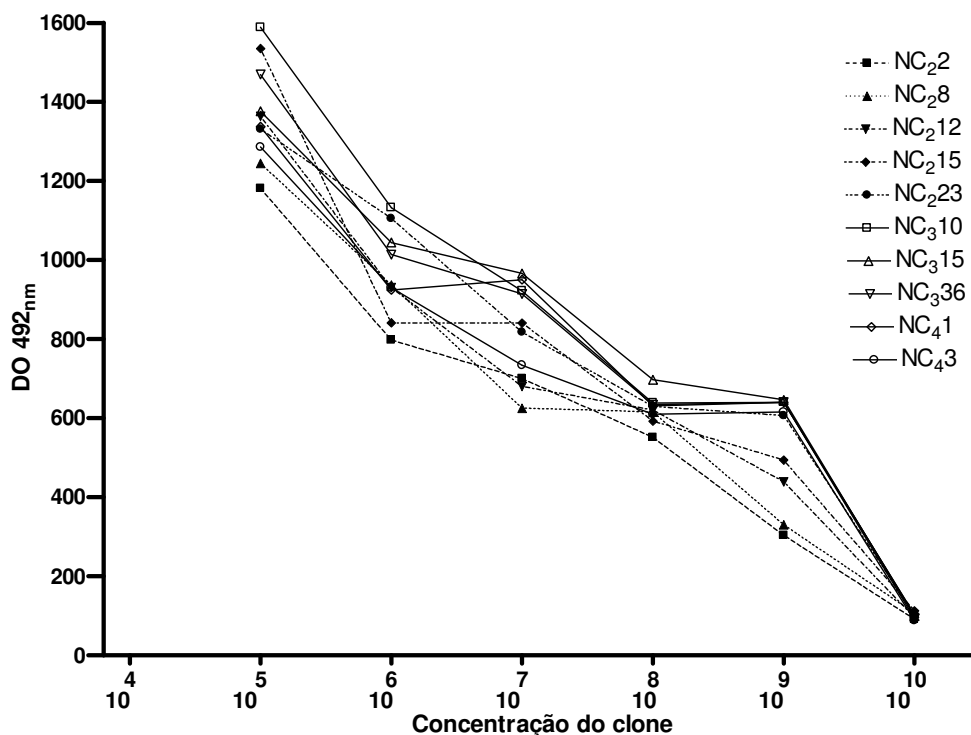


Figura 10- ELISA de competição com os clones selecionados.

Foram feitos os cálculos da sensibilidade, especificidade e eficiência do diagnóstico (ED) e Índice Youden (IY), os clones mais específicos e eficientes foram NC₄1, NC₄3 e NC₂12 (Tabela 10).

Tabela 10 - Sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e Índice de Youden obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando os clone selecionados.

Clone	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED (%)	IY
NC ₂ 2	80,0	96,3	86,7	0,76
NC ₂ 8	52,2	100	84,2	0,52
NC ₂ 12	95,0	93,8	94,2	0,88
NC ₂ 15	97,5	87,5	90,8	0,84
NC ₂ 23	97,5	86,5	90,0	0,83
NC ₃ 10	70,0	92,5	85,0	0,62
NC ₃ 15	65,0	96,3	85,8	0,61
NC ₃ 36	82,5	86,3	85,0	0,68
NC ₄ 1	100	92,5	95,0	0,92
NC ₄ 3	97,5	92,5	94,5	0,89

Amostras de soro de pacientes com outras parasitoses foram testadas para se verificar a ocorrência de reações cruzadas no teste ELISA (Tabela 11).

Tabela 11 - Reatividade das amostras de soro de pacientes do Grupo 2 (pacientes infectados com *Taenia* sp. e por outros parasitos) utilizando os clones de fagos selecionados.

	ELISA									
	N+ (%)									
	NC ₂ 2	NC ₂ 8	NC ₂ 12	NC ₂ 15	NC ₂ 23	NC ₃ 10	NC ₃ 15	NC ₃ 36	NC ₄ 1	NC ₄ 3
Grupo 2 (n=40)										
Ancilostomídeo (n=5)	0	0	0	2 (40)	2 (40)	1 (20)	0	5 (100)	0	0
<i>A. lumbricoides</i> (n=5)	1 (20)	0	0	1 (20)	1 (20)	0	0	3 (60)	0	0
<i>E. vermicularis</i> (n=4)	0	0	1 (25)	1 (25)	3 (75)	0	0	0	1 (25)	1 (25)
<i>S. stercoralis</i> (n=4)	0	0	1 (25)	1 (25)	1 (25)	1 (25)	0	1 (25)	1 (25)	1 (25)
<i>Taenia</i> sp. (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. nana</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. granulosus</i> (n=4)	0	0	0	1 (25)	0	0	0	1 (25)	2 (50)	1 (25)
<i>T. trichiura</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. mansoni</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	1	0	2	6	7	2	0	10	4	3

n+ = número de amostras positivas

5 - DISCUSSÃO

A tecnologia de *phage display* tem sido um avanço inovador. Estudos utilizando bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos têm se tornado metodologia importante para o encontro de ligantes para anticópos, enzimas, e outras moléculas protéicas ou não (PARHAMI-SEREN; KRUDYSZ; TSANTILI, 2002; CARDELLINI; FELICI; GIANFRANCESCHI, 2004). O que faz desta técnica única é o fato de que mesmo apresentando poucos peptídeos recombinantes em sua superfície, bacteriófagos podem ser utilizados como ferramentas para analisar e subsequentemente clonar a proteína de interesse com boa eficiência (GNANASEKAR; PADMAVATHI; RAMASWAMY, 2005).

Com base nos dados da literatura acredita-se que a metodologia escolhida para o presente estudo tenha sido adequada, uma vez que seqüências peptídicas que reconhecem altas quantidades de ligantes tais como anticorpos monoclonais, receptores e carboidratos foram identificadas com sucesso após seleção por *phage display* (ANDRE et al., 2005; LANG et al., 2006; BUCHWALD et al., 2005).

Apesar de *T. solium* causar uma doença parasitária importante em humanos e suínos, incluindo sua forma mais séria a manifestação no SNC, este parasito ainda não está bem caracterizado a nível molecular e o diagnóstico desta parasitose permanece como um desafio (ROBLES et al., 2005).

A seleção de peptídeos foi realizada contra as IgGs provenientes de soro de pacientes com NC, após passagem por uma seleção negativa com IgGs de controles e outras parasitoses. Para tanto, foi necessária a separação dessas IgGs. Muitas técnicas têm sido utilizadas para separação de proteínas, porém as técnicas de purificação por afinidade, aplicado sob substratos magnéticos têm se mostrado muito úteis (SAFARIK; SAFARIKOVA, 2004). A utilização de *beads* magnéticos foi importante por ser uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgG de boa qualidade utilizando-se pequena quantidade de amostra.

Durante a seleção dos peptídeos, foi esperado um enriquecimento do número de fagos durante os quatro ciclos de seleção uma vez que, a cada ciclo, clones/fagos com determinadas seqüências foram retidos para subsequente eluição e amplificação no ciclo seguinte. Porém, antes da entrada dos fagos selecionados serem colocados contra IgGs dos pacientes com NC, eles foram submetidos a uma forte seleção negativa, ficando retidos às IgGs controles, não restando-se então as IgGs NC e não permitindo o enriquecimento a cada ciclo. Os títulos dos fagos na entrada do *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados na placa ficaram ligados à estes pela

interação específica, e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos dos pacientes com NC foram removidos pelas lavagens. Fagos com baixa afinidade pelos anticorpos podem ficar aderidos diretamente à placa, não interagindo com os anticorpos, ou ainda permanecendo suspensos na solução (não ligados), assim após as sucessivas lavagens, muitos destes fagos não específicos são excluídos levando à redução nos títulos após as etapas de *biopanning*.

O programa AAFREQ realizou o cálculo das frequências de cada aminoácido selecionado. Os aa Cisteína, Glutamato, Glicina, Leucina, Metionina, Arginina, Serina e Valina tiveram a frequência observada significativamente menor que a frequência esperada, sendo assim selecionados negativamente. A baixa frequência de Cisteína e Arginina pode ser explicada pelo fato de atuarem na secreção de proteína III podendo interferir na infectividade dos fagos. Consequentemente, estes aa podem ser menos frequentes durante a seleção (NOREN; NOREN, 2001). Glutamato e a Glicina foram selecionados negativamente provavelmente pela sua baixa especificidade com o alvo, confirmando assim a especificidade da seleção.

O resultado fornecido pelos dados de frequência de Histidina, Alanina, Aspartato, Glutamina, Treonina e Triptofano e o resultado dos clones positivos para o ELISA reforçaram o fato de esses aa terem sido selecionados positivamente pela sua afinidade com os anticorpos, uma vez que apresentaram maiores frequências, maior reatividade e menos variabilidade dentre de determinadas posições. A alta frequência desses aminoácidos pode estar relacionada à um possível epítipo no qual os anticorpos se ligam. O fato das bibliotecas terem sido de peptídeos randômicos permitiu que vários clones pudessem compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes do peptídeo, fazendo com que certos aa fossem mais frequentes após a seleção e sequenciamento. Logo, a alta frequência desses aa, no peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias sequências (SOUZA, 2006).

Esta metodologia tem permitido a obtenção dos perfis epitópicos de parasitos de maneira eficiente, e também evita os processos sofisticados e demorados para obtenção de anticorpos monoclonais. Os perfis não apenas revelam funções importantes para cada antígeno, como também revelam as estruturas antigênicas na proteína que esta envolvida na indução de resposta imune (YANG et al., 2005).

Quando se analisou os clones obtidos frente às proteínas do gênero *Taenia* foi encontrada similaridade com diversas proteínas com várias funções, várias destas com

potencial para alvo de drogas ou vacinas, porém foram utilizadas para comparação as proteínas das espécies *T. solium* e *T. saginata*.

Os clones NC₂15 e NC₃15 tiveram similaridade com a proteína c-jun de *T. solium* e NC₄3 com c-fos, do mesmo parasito. Estas são altamente conservadas com relação a outras proteínas do parasito, sendo idênticas entre *T. solium* e *T. cracisseps*, estando relacionadas à proliferação e diferenciação celular do parasito e infecção, a influência destas proteínas afetam comportamento reprodutivo, e consequentemente na evolução parasito-hospedeiro. (MORALES-MONTOR et al., 2004).

O clone NC₂2 apresentou similaridade com um precursor de calreticulina, uma proteína ligante de cálcio de *T. solium*. A calreticulina é altamente conservada e multifuncional, encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático da maioria das células eucarióticas. Sua principal função é controlar a homeostasia do cálcio intracelular, mas também participa de processo de motilidade celular, secreção, adesão síntese protéica e expressão gênica. Após ser secretada pela célula a calreticulina pode se ligar ao C1q, interferindo na ativação da cascata do sistema complemento no local da inflamação pela ligação com C1q, interferindo com o complexo imune associado ao anticorpo (MICHALAK et al., 1999). Mendlovic et al. (2004) relataram a ligação não específica quando se testou soros de pacientes saudáveis contra a calreticulina purificada, desencorajando a utilização desta proteína para o diagnóstico da cisticercose.

Os peptídeos NC₂12 e NC₄1 se mostraram semelhantes às proteínas da família das anexinas, com capacidade de se ligar reversivelmente à fosfolipídeos aniônicos de uma maneira cálcio dependente, além de estarem associadas com diversos fenômenos relacionados à membrana com transportes, organização e formações de canais iônicos. A localização de cada anexina está relacionada à sua função biológica. A anexina B1 é encontrada no líquido de vesícula das formas metacestódeas de *T. solium* e sua distribuição coincide com o grau de inflamação granulomatosa ao redor. A anexina B2 possui função anticoagulante, uma vez que funciona como antagonista da glicoproteína IIb e IIIa (GAO et al., 2007).

NC₃36 mostrou similaridade com uma subunidade de ATPase transportadora de sódio e potássio. As ATPases são enzimas associadas à membrana e são responsáveis por estabelecer e manter a quantidade de íons intracelular e podem estar envolvidas na proteção do parasito contra respostas mediadas pelo complemento. Em *T. solium* a atividade das ATPases tem sido encontrada na superfície do cisticerco (WILLMS et al., 2004). Este clone também se mostrou similar ao antígeno de baixo peso molecular variante 1 de *T. solium*, uma glicoproteína

presente no líquido de vesícula das formas metacestódeas, utilizado no sorodiagnóstico humano e animal (SATO et al., 2006).

NC₂15 e NC₃15 se mostraram similares à paramiosina, também conhecida como antígeno B, que possui papel importante na sobrevivência do cisticerco por inibir a fração C1 da cascata do complemento, esta foi identificada como candidata para vacinas contra helmintos. O antígeno B é expresso especialmente na forma metacestódea de *T. solium* e tem função de proteção em suínos vacinados com esta proteína (VARGAS-PARADA; LACLETE, 2003; GUO et al., 2007).

NC₃10 se alinhou à TGTP1 de *T. solium*, um transportador de glicose que está na superfície externa das formas adultas e larvais e pode ser potenciais alvos para vacinas e candidato para intervenção contra parasito (RODRIGUES-CONTRERAS et al., 1998).

Pelos testes ELISA foi possível identificar a sensibilidade da seleção, visto que a maioria dos clones se ligou positivamente ao soro de pacientes com NC, enquanto que a maioria dos fagos não se ligou aos soros de pacientes com outras parasitoses e aparentemente saudáveis.

Os resultados falso-negativos podem também estar associados à casos assintomáticos da doença, uma vez que análises de protocolos de necropsias revelam pacientes com inúmeras calcificações e que, no entanto nunca relataram sintomas característicos para NC (REY, 2001). Zini; Farrel; Wadee (1990) sugeriram ainda que resultados falso-negativos podem ocorrer em casos onde a doença parenquimal está presente, sugerindo tolerância imunológica ao parasito ou uma baixa produção de anticorpos.

Além disso, a positividade observada entre algumas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2), possivelmente aconteceu devido à reações cruzadas, fato que ocorre principalmente em áreas endêmicas para cisticercose, conforme demonstrado por vários autores (ZINI; FARREL; WADEE, 1990; GARCIA et al., 1998; GARCIA et al., 2003; ISHIDA et al., 2003; PARIJA, et al., 2004). Bragazza et al. (2002) descreveram 20% de reações cruzadas em 1863 amostras de soro de indivíduos provenientes de áreas endêmicas.

O estudo dos indivíduos do Grupo 2, ou seja de indivíduos infectados por *Taenia* sp. e por outras parasitoses, é importante na análise dos dados porque representa a realidade da população, especialmente em nosso país onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes. A reatividade cruzada para pacientes infectados por *A. lumbricoides* pode estar relacionada à infecções concomitantes desses pacientes com ambas as espécies ou a presença de anticorpos remanescentes de infecções prévias, visto que as amostras de soro foram provenientes da população do Estado de Minas Gerais, região considerada endêmica para o

complexo teníase-cisticercose, conforme dados da literatura (SILVA-VERGARA et al., 1998; SILVEIRA-LACERDA et al., 2002).

Alguns clones (NC₂₂, NC₂₈, NC₂₁₂, NC₃₁₅ e NC₃₁₀) não reagiram com amostras de soro de pacientes infectados com *E. granulosus*, o que demonstra um grande avanço, uma vez que a reatividade cruzada é frequentemente relatada (ITO; NAKAO; KUTSUMI, 1993; GARCIA et al. 1998, MACHADO et al., 2007).

Vários autores testaram diferentes antígenos, purificados ou recombinantes, com diferentes índices de sensibilidade e especificidade. Bueno et al. (2005) testaram uma das 18 proteínas de 8-kDa, a TS18 variante 1 e o antígeno GP 50 recombinante para detectar NC em amostras de soro e obtiveram, respectivamente, 94,7% e 90,4% de sensibilidade e 90,3% e 93,8% de especificidade. Lee et al. (2005) analisaram um antígeno recombinante de 10 kDa expresso em baculovírus para o sorodiagnóstico de NC obtendo um teste 94,3% sensível e 96,4% específico. Ferrer e colaboradores (2005) testaram peptídeos de oncosfera obtendo 85% de sensibilidade e 83,5% de especificidade. O antígeno diagnóstico T24 foi avaliado e apresentou sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 94% e 98% (HANCOCK et al., 2006). Machado et al. (2007) obtiveram um teste 92,5% sensível e 93,3% específico quando testaram a fração detergente do extrato total de metacestódeos de *T. solium* fracionados com triton X-114. Frações antigênicas de cisticercos de *T. solium* com baixa massa molecular (20–24 kDa) foram testados para detecção de NC em amostras de soro alcançando 86,2% de sensibilidade e 100% de especificidade (MANDAL et al., 2008). Os fagos testados no presente estudo obtiveram sensibilidade e especificidade semelhantes ou superiores àqueles demonstrados pelos autores citados.

Esta técnica permitiu verificar um perfil epitópico do parasito de uma forma eficiente sem a realização de processos difíceis para se obter anticorpos monoclonais, resultando em um teste imunodiagnóstico sensível e específico.

A tecnologia de *phage display* possibilitou informações importantes sobre a resposta sorológica na infecção por *T. solium*. O *biopanning* utilizando bibliotecas de fagos tem identificado antígenos potenciais sem o conhecimento prévio dos principais alvos de anticorpos, resultando em antígenos com potencial para utilização nos testes ELISA. Como técnica ela poderia ser aplicada para identificar antígenos diagnósticos específicos para outros agentes infecciosos onde os domínios de ligação de anticorpos ainda não são conhecidos para a identificação de especificidades de anticorpos em nível de aa, para o desenvolvimento de novos reagentes para testes imunodiagnósticos simples e sensíveis e para o entendimento dos

mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune para antígenos conhecidos ou não de patógenos (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

A aplicabilidade em campo do ensaio utilizando os clones obtidos é realmente promissora devido à baixa reatividade cruzada apresentada pelos clones selecionados com soro de pacientes com outras parasitoses que também ocorrem em áreas endêmicas para cisticercose. Antígenos proteicos sintéticos e/ou recombinantes resultam em aplicações diagnósticas simplificadas, de baixo custo e se apresentam como alternativas aos antígenos nativos. Com os esforços dos programas de erradicação da cisticercose, antígenos nativos do parasito se tornam cada vez mais difíceis de obter, fazendo dos clones de fagos alternativas para utilização no diagnóstico (SCHEEL et al., 2005). Peptídeos recombinantes de *T. solium* são úteis para o diagnóstico, resultando em ferramentas para estudo *in vitro* da cisticercose.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ A tecnologia de *phage display* mostrou-se eficiente para a seleção de peptídeos recombinantes reativos com anticorpos policlonais de pacientes com NC, os clones obtidos encontram-se em fase de patenteamento;
- ✓ A maioria dos mimetopos obtidos neste estudo não apresentaram reatividade com soro de pacientes infectados com *E. granulosus*, o que torna este peptídeos potenciais biomarcadores da NC; capazes de distinguir os pacientes com hidatidose por *E. granulosus* dos pacientes com NC;
- ✓ A alta especificidade e sensibilidade dos clones de fagos no teste ELISA fazem desta uma importante fonte antigênica potencialmente aplicável no diagnóstico da NC;
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho são promissores no sentido da utilização destes fagos para a identificação de anticorpos no diagnóstico da doença.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ADITYA, G.S.; MAHADEVAN, A.; SANTOSH, V.; CHICKABASAVIAH, Y.T.; SHWATHNARAYANARAO, C.B.; KRISHNA, S.S. Cysticercal chronic basal arachnoiditis with infarcts, mimicking tuberculous pathology in endemic áreas. **Neuropathology**, Sendai, v.24, n.4, p.320-325, 2004.

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

ALVAREZ, J.I.; RIVERA, J.; TEALE, J.M. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.2, n.4, p.1-12, 2008.

ANDRE, S.; ARNUSCH, C.J.; KUWABARA, I.; RUSSWURM, R.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J.; PIETERS, R.J. Identification of peptide ligands for malignancy- and growth-regulating galectins using random phagedisplay and designed combinatorial peptide libraries. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v.13, p.563–573, 2005

ANTONIUK, S. Epidemiología de la neurocisticercosis. **Revista de Neurologia**, São Paulo, v.29, n.4, p.331-333, 1999.

ARAMBULO III, P. V.; WALLS, K. W.; BULLOCK, S.; KAGAN, I. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 35, p. 63-67, 1978.

ARAP, M.A. Phage display technology: applications and innovatios. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.1, p.1-9, 2005.

ARAP, W.; KOLONIN, M.G.; TREPEL, M.; LAHDERANTA, J. ; CARDO-VILA, M. ; GIORDANO, R.J.; MINTZ, P.J.; ARDELT, P.U.; YAO, V.J.; VIDAL, C.I.; CHEN, L.; FLAMM, A.; VALTANEN, H.; WEAVIND, L.M.; HICKS, M.E.; POLLOCK, R.E.; BOTZ, G.H.; BUCANA, C.D.; KOIVUNEN, E.; CAHILL, D.; TRONCOSO, P.; BAGGERL, K.A.; PENTZ, R.D.; DO, K.A.; LOGOTHETIS, C.J.; PASQUALINI, R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nature Medicine**, New York, v.8, n. 2, p.121-127, 2002.

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

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.

BAIR, C.L.; OPPENHEIM, A.; TROSTEL, A.; PRAG, G.; ADHYA, S. A phage display system designed to detect and study protein-protein interactions. **Molecular Microbiology**, Boston, vol. 67, n. 4, p. 719-728, 2008.

¹ Segundo normas da ABNT, NBR 6023:2002

BAR, H.; YACOBY, I.; BENHAR, I. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. **BMC Biotechnology**, London, v.8, p.37-50, 2008.

BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. **Phage display. A laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7, 2001.

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

BENEDETTI, M.R.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com Neurocisticercose atendidos no hospital universitário regional de maringá, Paraná, Brasil, **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.65, n.1, p.124-129, 2007.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.19, p. 1-33, 2001.

BIRCH-MACHIN, I.; RYDER, S.; TAYLOR, L.; INGUEZ, P.; MARAULT, M.; CEGLIEC, L.; ZIENTARA, S.; CRUCIERE, C.; CANCELLOTTI, F.; KOPTOPOULOS, G.; MUMFORD, J.; BINNS, M.; DAVIS-POINTER, N. Utilization of bacteriophage display libraries to identify peptide sequences recognized by Equine herpes virus type 1 specific equine sera. **Journal of Virological Methods**, Netherlands, v.88, p. 89-104, 2000.

BOPPRE, M.C.P.; WILLE, P.R.; GUARNIERI, R.; REZEK, K.; CARQUEJA, C.; TREVISOL-BITTENCOURT, P.C.; WALZ, J.C.; BIANCHIN, M.; VON WANGENHEIM, A.; CHAVES, M.L.; WALZ, R. Cognitive performance of patients with epilepsy and calcified neurocysticercosis lesions: a case-control study. **Epilepsy and Behavior**, San Diego, v.2, n.6, p.558-562, 2001.

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

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas apresentadas em FAGOS. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p. 44-51, 2002.

BUCHWALD, U.K.; LEES, A.; STEINITZ, M.; PIROFSKI, L.A. A peptide mimotope of type 8 pneumococcal capsular polysaccharide induces a protective immune response in mice. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.73, p.325–333, 2005.

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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.72, n.3, p.278-283, 2005.

CARDELLINI, E.; FELICI, F.; GIANFRANCESCHI, G.L. Identification of peptides mimicking the ligands of proteins phosphorylated by protein kinase CK2. **Peptides**, New York, v.25, p.191–197, 2004.

CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.2, n.12, p.751-762, 2002

CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W.A. Cysticercosis and epilepsy: A critical review. **Epilepsia**, New York, v.39, n.10, p.1025-1040, 1998.

CAVELLANI, C.L.; FALEIROS, A.C.G.; LINO JRC, R.S.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Cysticercosis in the elderly. **Annals of Diagnostic Pathology**, Philadelphia, v.11, p.330–333, 2007.

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

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

COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M.; CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoassay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 24, n. 6, p. 337-341, 1982.

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

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

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

DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J. Etiopatogenia de la neurocisticercosis. **Revista Ecuatoriana de Neurologia**, Guayaquil, v.2, p.22-32, 1993.

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

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

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

DORNY, P.; BRANDT, J.; SOLÝ', A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis, **Acta Tropica**, Amsterdam, n. 87, p.79– 86, 2003.

DROMEY, J.A.; WEENINK, S.M.; PETERS, G.H.; ENDL, J.; TIGHE, P.J.; TODD, I.; DU, B.; QIAN, M.; ZHOU, Z.; WANG, P. ; WANG, L. ; ZHANG, X. ; WU, M. ; ZHANG, P.; MEI, B. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. **Biochemical Biophysical Research Communications**, San Diego, v.342, n.3, p.956-962, 2006.

DYBWAB, A.; LAMBIN, P.; SIOUD, M.; ZOUALI, M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.57, n.6, p. 583-590, 2003.

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

FERREIRA, A. P.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; SASAKI, A. T.; FERREIRA, W.; LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 29-33, 1997.

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

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

FLISSER, A.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J. P. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. **Investigación y Ciencia**, Barcelona, p. 24-33, 2006.

FORLENZA, O. V.; VIEIRA-FILHO, A. H.; MACHADO, L.R.; NOBREGA, J. P.; BARROS, N. G. Depressive disorders associated with neurocysticercosis: prevalence and clinical correlations. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.56, n.1, p.45-52, 1998.

GAO, Y.J.; YAN, H.L.; DING, F.X.; LU, Y.M.; SUN, S.H. Annexin B1 at the host–parasite interface of the *Taenia solium cysticercus*: Secreted and associated with inflammatory reaction. **Acta Tropica**, Amstredam, v.101, p.192–199, 2007.

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

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

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

GARCIA, H. H.; DEL BRUTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE, A. C.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 3-9, 2005.

GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.W.; GILMAN, R.H. Cysticercosis Working Group in Peru. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.92, n.4, p.411-414, 1998.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GAVIDIA, C.; FALCON, N.; BERNAL, T.; VERASTEGUI, M.; RODRIGUEZ, S.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. Seroincidence of porcine *T. solium* infection in the Peruvian highlands. **Preventive Veterinary Medicine**, New York, v. 57, p. 227-236, 2003.

GARCÍA, H.H.; GONZÁLEZ, A.E.; DEL BRUTTO, O.H.; TSANG, V.C.W.; LLANOS-ZAVALAGA, F.; GONZALVEZ, G.; ROMERO, J.; GILMAN, R.H. Strategies for the elimination of taeniasis/cisticercosis for The Cysticercosis Working Group in Peru, **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.262, p.153–157, 2007.

GAZARIAN, K.G.; GAZARIAN, T.G.; SOLIS, C.; HERNANDEZ, R.; SHOEMAKER, C.B.; LACLETTE, J.P. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. **Immunology Letters**, Netherlands, v. 42, p. 191-195, 2000.

GNANASEKAR, M.; PADMAVATHI, B.; RAMASWAMY, K. Cloning and characterization of a novel immunogenic protein 3 (NIP3) from *Brugia malayi* by immuno screening of a phage-display cDNA expression library, **Parasitology Research**, Berlin, v.97, p.49–58, 2005.

GNANASEKAR, M.; ANANDHARAMAN, V.; ANAND, S.B.; NUTMAN, T.B.; RAMASWAMY, K. A novel small heat shock protein 12.6 (HSP12.6) from *Brugia malayi* functions as a human IL-10 receptor binding protein. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, n.159, p. 98-103, 2008.

GOBBI, H.; ADAD, S.J.; NEVES, R.R.; ALMEIDDA, H. O. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) em pacientes necropsiados em Uberaba. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 9, p. 51-59, 1980.

GREENWOOD, J.; WILLIS, A.E.; PERHAM, R.N. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 220, p.821, 1991.

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

HAMED, S.A.; EL-METAAL, H.E. Unusual presentations of neurocysticercosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.115, n.3, p.192–198, 2007.

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

HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; WHITFIELD, F.D.; YUSHAK, M.L.; LANE, W.S.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.147, n.1, p.109-17, 2006.

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

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

HOF, D.; HOEKE, M.O.; RAATS, J.M.H. Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.151, p.367–377, 2007.

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

HUERTA, M.; AVILA, R.; JIMENEZ, H.I.; DIAZ, R.; DIAZ, J.; DIAZ HUERTA, M.E.; HERNANDEZ, M.; MARTINEZ, J.J.; GARATE, T.; GOMEZ, E.; ABAD, T.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E. Parasite contamination of soil in households of a Mexican rural community endemic for neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.102, p. 374-379, 2008.

IRVING, M.B.; PAN, O.; SCOTT, J.K. Random peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.5, p.314-324 2001.

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

ITO, A.; NAKAO, M.; KUTSUMI, H. Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by western blotting. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.87, n.2, p.170-172, 1993.

ITO, A.; NAKAO, M.; WANDRA, T. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. **The Lancet**, London, v. 362, p. 1918-1920, 2003.

ITO, A.; URBANI, C.; JIAMIN, Q.; VUITTON, D. A.; DONGCHUAN, Q.; HEATH, D. D.; CRAIG, P. S.; ZHENG, F.; SCHANTZ, P. M. Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.86, p.3-17, 2003.

JOHNSTONE, A.P.; THORPE, R. Immunochemistry in practice. **Blackwell Science**, Oxford, 318 p., 1987.

KONG Y, CHO S Y, KIM S I, KANG S Y. Immunoelectrophoretic analysis of major component proteins in cystic fluid of *Taenia solium* metacestodes. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.30, p.209-218, 1992.

KRAFT, R. Cysticercosis: An Emerging Parasitic Disease, **American Family Physician**, Kansas, v.75, p.91-96, 2007.

KRECEK, R.C.; MICHAEL, L.M.; SCHANTZ, P.M.; NTANJANA, L.; SMITH, M.F.; DORNY, P.; HARRISON, L.J.S.; GRIMM, F.; PRAET, N.; WILLINGHAM III, A.L. Prevalence of *Taenia solium* cysticercosis in swine from a community-based study in 21 villages of the Eastern Cape Province, South Africa. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, p. 38–47, 2008.

KUMAR, G. R. Diagnosis criteria for neurocysticercosis: some modifications are needed for Indian patients. **Neurology India**, Bombay, v. 52, n. 2, p. 171-177, 2004.

KYVSGAARD, N.; JOHANSE, M.V.; CARABIN, H. Simulating transmission and control of *Taenia solium* infections using Reed-Frost stochastic model. **International Journal for Parasitology**, New York, v.37, n. 5, p. 547-558, 2007.

LANG, J.S.; ZHAN, J.B.; XU, L.H.; YAN, Z.K. Identification of peptide mimetics of xenoreactive a-Gal antigenic epitope by phage display. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.344, p.214–220, 2006.

LANZILLOTTI, R.; COETZER, T.L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends in Parasitology**, Oxford, v.24, n.1, p. 18-23, 2008.

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

LIMA, J. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; GARCIA, L. V.; LEITE, J. P. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Bornova, v. 217, p. 31-35, 2004.

LÓPEZ, I.C.; BERMEJO, P.G.; ESPIGA, P.J.G.R.; TAPIA, D.Q. Parkinsonismo sensible a levodopa en neurocisticercosis, **Neurología**, Bogota, n.23, p.3-5, 2008.

MACHADO, A. 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**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 181-183, 1973.

MACHADO, G.A.; SANTIAGO, F.M.; MINEO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.12, n. 11, p. 1-8, 2007.

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

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

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA,E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 91, n.1, p. 117-121, 1999.

MANOUTCHARIAN, K.; DIAZ-OREAB, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.;GONZALEZ, E.; ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GOMEZ-CONDEB, E.; SCIUTTO, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 99, p.11-24, 2004.

MATSUMOTO, S.E.; YAMASHITA, M.; KATAKURA, Y.; AIBA, Y.; TOMIMATSU, K.; KABAYAMA, S.; TERUYA, K.; SHIRAHATA, S. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by in vitro immunization and the phage display method. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, 2008, *Article in press*.

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

MENDES, E. C.; SILVA, S. S.; FONSECA, E. A. LA TERZA; SOUZA, H. R. R.; CARVALHO, R. W. Human neurocysticercosis in Baixada Fluminense, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 1058-1062, 2005.

MENDLOVL, F.; OSTOA-SALOMAT, P.; SOLFST, C.F.; MARTINEZ-OCAFIAT, J.; FLLSSER, A.; LACLETTET, J.P. Cloning, Characterization, and Functional Expression of *Taenia Solium* Calreticulin **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.90, n.4, p. 891-893, 2004.

MERSICH, C.; JUNGBAUER, A. Generation of bioactive peptides by biological libraries. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 861, p.160-170, 2008.

MICHALAK, M.; MESAELI, E.; NAKAMURA, K.; OPAS, M. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. **Biochemical Journal**, London, v.344, p. 281-292, 1999.

MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; LEAL, G.S.; VIDIGAL, L.H.G.; TÁPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 273p.

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

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

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

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

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

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

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

PARHAMI-SEREN, B.; KRUDYSZ, J.; TSANTILI, P. Affinity panning of peptide libraries using anti-streptokinase monoclonal antibodies: selection of an inhibitor of plasmin(ogen) active site. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.267, p.185–198, 2002.

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

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

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

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

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

PHIZICKY, E.M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detections and analysis. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.1, p. 94-123, 1995.

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

PRABHAKARAN, V.; VENKATA RAGHAVA, M.; RAJSHEKHAR, V.; MULIYIL, J.; OOMMEN A. Seroprevalence of *Taenia solium* antibodies in Vellore district, south Índia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.102, p. 246-250, 2008.

PRUDÊNCIO, C. R. **Desenvolvimento de peptídeos recombinantes epítomos específicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* selecionados por bibliotecas de *phage display***. 2008, 150 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) –Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

PUSHKER, N.; BAJAJ, M. S.; BALASUBRAMANYA, R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. **Journal of Infection**, Kent, v. 51, n. 5, p. 245-248, 2005.

RAJKOTIA, Y.; LESCANO, A.G.; GILMAN, R.H.; CORNEJO, C.; GARCIA, H.H. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.101, n.8, p.840-846, 2007.

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

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

RODRIGUEZ, U. ; RIOS, C. ; CORONA, T. ; TALAYERO, B. ; OSTROSKY-WEGMAN, P.; HERRERA, L.A. Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, *Article in press*, 2008.

RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; SKELLY, P.J.; LANDA, A.; SHOEMAKER, C.B.; LACLETTE, J.P. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. **Parasitology**, London, v.117, p. 579-588, 1998.

RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Molecular Microbiology**, Boston, England, v.5, p. 1607-1613, 1991.

SA, D.S.; TEIVE, H.A.; TROIANO, A.R.; WERNECK, L.C. Parkinsonism associated with neurocysticercosis. **Parkinsonism Related Disorders**, Kidlington, v.11, n.1, p.69-72, 2005.

SAENZ, B.; RAMIREZ, J.; ALUJA, A.; ESCOBAR, A.; FRAGOSO, G.; MORALES, J.; PEREZ-TAMAYO, J.; ROSETTI, F.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E.; FLEURY, A. Human and porcine neurocysticercosis: differences in the distribution and developmental stages of cysticerci. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.13, n. 5, p. 697–702, 2008.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **BioMagnetic Research and Technology**, London, p. 2-7, 2004.

SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 87, p. 137-143, 2003.

SATO, M.O.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; ITO, A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.194, n.12, p.1783-1790, 2006.

SCHEEL, C.M.; KHAN, A.; HANCOCK, K.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W and The Cysticercosis Working Group In Peru. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kd proteins: Comparison of assay formats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.73, n.4, p. 771-776, 2005.

SCIUTTO, E.; CHAVARRIA, A.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LARRALDE, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury, **Parasite Immunology**, Oxford, v.29, p. 621–636, 2007.

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

SHUKLA, N.; HUSAIN, N.; AGARWAL, G.G.; HUSAIN, M. Utility of *Cysticercus fasciolaris* antigen in dot ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. **Indian Journal of Medical Sciences**, Bombay, v.62, n.6, p.222-227, 2008.

SIKASUNGE, C.S.; PHIRI, I.K.; PHIRI, A.M.; et al. Risk factors associated with porcine cysticercosis in selected districts of Eastern and Southern provinces of Zambia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, p. 59–66, 2007.

SILVA JR, R.A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F.F.T.; GATTI, M.S.V.; DOLDER, H.; SCHUMACHER, R.I.; JULIANOS, M.A.; SILVA, M.J.; LEITE, A. avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptide selected from a phage display library. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.120, p.53-60, 2002.

SILVA-VERGARA, M.L.; VIEIRA, C.O.; CASTRO, J.H.; MICHELLETTI, L.G.; OTANO, A.S.; FRANQUINI JÚNIOR, J.; PRATA, A. Aspectos epidemiológicos da teníase-cisticercose na área endêmica de Lagamar, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.28, n.4, p.345-349, 1995.

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

SIMONS, G.F.; KONINGS, R.N.; SCHOENMAKERS, J.G. **Proceedings of National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v.78, p. 4194-4198, 1981.

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

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

SOUSA, A.Q.; SA, H.L.; QUEIROZ, T.R.; HORTA, W.G.; PEARSON, R.D. Neurocysticercosis in Ceara State, northeastern Brazil: a review of 119 cases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, n.6, p.759-62, 1998.

SOUZA, P. S. **Seleção e caracterização de peptídeos recombinantes miméticos de antígenos do vírus da dengue por Phage Display**. Uberlândia (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, 2006. 91p.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid: immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 16-20, 1993.

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

TAKAYANAGUI, O. M.; ODASHIMA, N. S. Clinical aspects of neurocysticercosis. **Parasitology International**, Kyoto, v.55, p. 111-115, 2006.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. Enzyme-linked immuno electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 159, n. 1, p. 50-59, 1989.

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

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

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

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

WANG, I.C.; FAN, P.C.; LU, S.C.; FAN, C.K.; SU, K.E. Suppression of host Th1-type granulomatous inflammation by *Taenia solium* metacestodes is related to down-regulation of osteopontin gene expression. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 38, p. 239–248, 2008.

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

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

WILLMS, K.; SHOEMAKER, C.B.; SKELLY, P.J.; LANDA, A. Cloning and expression of a Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit from *Taenia solium* (TNaK1). **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.138, p.79–82, 2004.

WU, H.W.; HU, X.M.; WANG, Y.; KURTIS, J.D.; ZENG, F.J.; MCGARVEY, S.T.; WU, G.L.; ZHANG, Z.S.; HUA, Z.C. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.99, p. 200–207, 2006.

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

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

YANG, W.J.; SHIUAN, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.276, p. 175-183, 2003.

YEH, S.J.; WU, R.M. Neurocysticercosis presenting with epilepsia partialis continua: a clinicopathologic report and literature review. **Journal of Formosan Medical Association**, Taipei, v. 107, n.7, p.576-581, 2008.

ZINI, D.; FARREL, V.J.R.; WADEE, A.A. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, London, v.53, n.8, p.656-661, 1990.