



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

Heliana Batista de Oliveira

**Avaliação de Frações Antigênicas da Forma
Metacestódea de *Taenia saginata* no Imunodiagnóstico
da Neurocisticercose Humana**

Uberlândia - MG
2008



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

Heliana Batista de Oliveira

**Avaliação de Frações Antigênicas da Forma
Metacestódea de *Taenia saginata* no Imunodiagnóstico
da Neurocisticercose Humana**

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

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

Uberlândia - MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O48a Oliveira, Heliana Batista de, 1981-
Avaliação de frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia saginata* no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana / Heliana Batista de Oliveira. - 2008.
111 f. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa-Cruz.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Cisticercose cerebrospinal - Teses. 2. Cisticercose cerebrospinal - Diagnóstico - Teses. 3. *Taenia*. 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

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Esta Tese foi desenvolvida com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Dedicatória

A Deus,

Pelos obstáculos vencidos e por tornar possível mais esta vitória.

Aos meus pais,

Hélio Oliveira da Silva e Ana Maria Silva Batista, por minha vida, pela confiança depositada e pelo orgulho constante e incentivador.

À minha irmã,

Aline Batista de Oliveira, pela grande amizade, por me estimular a ser cada vez melhor e me tornar um bom exemplo.

Ao meu marido,

Pablo Marques Barbosa, por compreender minha ausência e pelo apoio nas horas difíceis. Seu orgulho foi fonte inspiradora neste trabalho.

“A vocês, minha eterna gratidão por iluminarem minha vida e fazer de cada dia um maravilhoso milagre. Amo vocês”

Agradecimentos

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz pela orientação, exemplo e dedicação que servem de exemplo à minha vida profissional.

Ao Dr. Leandro Pajuaba de Moura pelo auxílio na obtenção e seleção das amostras biológicas.

À bióloga Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires pela essencial contribuição durante este trabalho, pela grande amizade e exemplo de vida.

À Dra. Gleyce Alves Machado pela importante e fundamental participação neste trabalho, pelo acolhedor e familiar apoio durante minha estadia nesta cidade e sincera amizade que tanto estimo.

À Flávia de Assunção Gonçalves pela amizade construída ao longo deste período, pelo acolhimento e momentos alegres compartilhados .

À Rosângela Maria Rodrigues pelo apoio, amizade e momentos de descontração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelo apoio durante o período de minha formação.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Parasitologia pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão, pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia por todos os títulos obtidos nos últimos nove anos. Minha eterna gratidão e apreço.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1 – INTRODUÇÃO	12
1.1 – Aspectos morfológicos de <i>Taenia solium</i> e <i>Taenia saginata</i>	13
1.2 – Aspectos biológicos e clínicos.....	14
1.3 – Resposta imune na neurocisticercose humana.....	17
1.4 – Epidemiologia e medidas de controle do complexo Teníase-Cisticercose	18
1.5 – Diagnóstico da cisticercose humana.....	23
1.6 – Interações lectina-carboidrato.....	26
1.7 – Utilização de glicoproteínas no diagnóstico da cisticercose humana.....	27
1.8 – Utilização de antígenos alternativos no diagnóstico da cisticercose humana.....	29
2 – OBJETIVOS	33
2.1 – Objetivo geral.....	33
2.2 – Objetivos específicos.....	33
3 – MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 – Aspectos éticos.....	34
3.2 – Procedência das amostras biológicas.....	34
3.2.1 – Procedência das amostras de soro.....	34
3.2.2 – Procedência das amostras de líquido cefalorraquidiano.....	35
3.3 – Amostras de soro.....	35
3.3.1 – Amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (Grupo 1)	36
3.3.2 – Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo <i>Taenia</i> sp (Grupo 2).....	38
3.3.3 – Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis (Grupo 3).....	38
3.4 – Amostras de líquido cefalorraquidiano.....	39
3.4.1 – Amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocisticercose (Grupo 4).....	39
3.4.2 – Amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com outras manifestações neurológicas (Grupo 5).....	39
3.5 – Obtenção das formas metacestódeas de <i>T. solium</i> e <i>T. saginata</i>	39
3.6 – Extratos salinos totais de metacestódeos de <i>T. solium</i> e de <i>T. saginata</i>	40
3.7 – Fracionamento dos extratos antigênicos por cromatografia de afinidade.....	41
3.7.1 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Jacalina do extrato salino total de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	41

3.7.2 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Concanavalina A do extrato salino total de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	42
3.7.3 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Concanavalina A da fração não ligante de Jacalina (FNL-J).....	43
3.7.4 – Cromatografia em coluna de Agarose®-N-acetil-glicosamina do extrato salino total de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	44
3.8 – Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas.....	45
3.8.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	45
3.8.2 – Coloração do gel por nitrato de prata.....	46
3.9 – Testes Imunológicos.....	47
3.9.1 – ELISA – Determinação da titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase.....	47
3.9.2 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> no soro e líquido cefalorraquidiano.....	47
3.9.3 - <i>Immunoblotting</i> - Determinação da diluição das amostras biológicas e da titulação ideal para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i>	49
3.9.4 - <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos IgG anti metacestódeos de <i>T. solium</i>	49
3.10 – Normas de biossegurança.....	50
3.11 – Análise dos dados.....	50
4 – RESULTADOS	52
4.1 – Fracionamento do extrato salino de metacestódeos de <i>T. saginata</i> por cromatografia de afinidade.....	52
4.2 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> utilizando S MTsa e suas frações obtidas por cromatografia de afinidade.....	63
4.3 - <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> utilizando S MTsa e suas frações obtidas por cromatografia de afinidade.....	75
4.4 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> no líquido cefalorraquidiano utilizando S MTso, S MTsa e FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa.....	81
4.5 – <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> no líquido cefalorraquidiano utilizando S MTso, S MTsa e FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa.....	88
5 – DISCUSSÃO	91
6 – CONCLUSÕES	96
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

RESUMO

A utilização de metacestódeos de *Taenia saginata* como antígeno alternativo constitui uma importante ferramenta no sorodiagnóstico da neurocisticercose humana (NC). A reatividade cruzada com indivíduos infectados por *Echinococcus granulosus* é comum em antígenos homólogos e heterólogos, podendo ser evitada com diferentes métodos de purificação. O presente estudo analisou as diferentes frações antigênicas obtidas, a partir do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*, por cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina (fração ligante e não ligante), de Concanavalina A (fração ligante e não ligante), de Concanavalina A utilizando a fração não ligante de Jacalina (fração ligante e não ligante) e Coluna de N-acetil (fração ligante e não ligante). As frações foram avaliadas quanto a detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *Taenia solium* nos testes ELISA e *Immunoblotting*. Foi avaliada a utilização do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* como antígeno alternativo nos testes ELISA e *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG no LCR. Foram obtidas 142 amostras de soro, sendo 40 de pacientes com diagnóstico definitivo de NC, 62 de indivíduos infectados por *Taenia* sp e por outros parasitos e 40 de indivíduos saudáveis. Foram coletadas 70 amostras de LCR, sendo 35 de pacientes com diagnóstico definitivo de NC e 35 de indivíduos com outras manifestações neurológicas. Entre todas as frações analisadas, a fração não ligante de Concanavalina A demonstrou maior sensibilidade e especificidade pelo teste ELISA em amostras de soro (90% e 93,1%, respectivamente). Pelo *Immunoblotting* esta mesma fração demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade, sendo que apenas pacientes com NC reconheceram a banda específica de 64-68 kDa, indicando que esta fração antigênica pode se usada como antígeno específico no sorodiagnóstico da NC humana. A sensibilidade e especificidade do teste ELISA utilizando o antígeno homólogo no LCR humano foi de 100%. Quando este teste foi conduzido com o antígeno heterólogo obteve-se 100% de sensibilidade e 94,3% de especificidade. Na reação de *Immunoblotting* as bandas antigênicas de 47-52, 64-68 e 70 kDa foram reconhecidas exclusivamente no LCR de pacientes com NC. Os resultados conferem ao extrato salino de *T. saginata* sensibilidade e especificidade para ser utilizado como antígeno alternativo para o diagnóstico da NC no LCR.

Palavras-chaves: Neurocisticercose, *Taenia saginata*, concanavalin A, jacalina, N-acetilglicosamina, líquido cefalorraquidiano, soro, ELISA, *immunoblotting*

ABSTRACT

Application of *Taenia saginata* metacestodes as alternative antigen is an important alternative for neurocysticercosis (NC) serodiagnosis. The cross reaction with *Echinococcus granulosus* infection occurred in homologous and heterologous antigens, and could be avoid with different purified methods. This study analyzed antigen fractions obtained from crude saline extract of *T. saginata* metacestodes purified by affinity chromatography with the lectin jacalin (unbound and bound fraction), concanavalin A (unbound and bound fraction), concanavalin A using jacalina unbound fraction (unbound and bound fraction) and N-acetil (unbound and bound fraction). The fraction were tested for the detection of IgG antibodies by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot for the laboratory diagnosis of human NC. The application of *T. saginata* metacestodes as an alternative antigen for use in ELISA and WB tests compared with the metacestodes antigen of *Taenia solium* in CFS samples was also analyzed. Serum samples were obtained from 142 individuals: 40 were diagnosed with NC, 62 presented *Taenia* sp. and other parasitic diseases and 40 were apparently healthy individuals. The CSF samples were obtained from 35 patients with definitive neurocysticercosis; and 35 patients with other neurological disorder. Among the fractions, unbound concanavalin A demonstrated statically higher sensitivity and specificity by ELISA (90% and 93.1 %, respectively). By Immunoblot, the concanavalin unbound showed 100% of sensitivity and specificity, where only serum samples from patients with NC recognized the protein of 64-68 kDa, so this antigen fraction may be used as specific antigen for diagnosis of NC. The sensitivity and specificity of ELISA using antigen obtained from *T. solium* applied to CSF samples results of 100%. When the tests were conducted using *T. saginata* metacestodes, results were 100% and 94.3%, respectively. The 47-52, 64-68 and 70 kDa antigens were recognized by only CSF samples from patients with NC. The results indicated that *T. saginata* metacestodes can be used as alternative antigen for NC diagnosis using LCR samples.

Keywords: Neurocysticercosis, *Taenia saginata*, concanavalin A, jacalin, N-acetilglycosamin, ELISA, cerebrospinal fluid, serum, *immunoblotting*

LISTA DE ABREVIATURAS

ConA	Concanavalina A
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
ED	Eficiência do diagnóstico
EITB	<i>Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FL-ConA	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , ligante de Concanavalina A
FL-ConAJ	Fração, da fração não ligante de Jacalina, ligante de Concanavalina A
FL-J	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , ligante de Jacalina
FL-N	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , ligante de N-acetil-glicosamina
FNL-ConA	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , não ligante de Concanavalina A
FNL-ConAJ	Fração, da fração não ligante de Jacalina, não ligante de Concanavalina A
FNL-J	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , não ligante de Jacalina
FNL-N	Fração, do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i> , não ligante de N-acetil-glicosamina
GP	Glicoproteínas
IgG	Imunoglobulina G
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IR	Índice de reatividade
IY	Índice de Youden
kDa	kilodaltons
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LLGP	Glicoproteínas antigênicas purificadas por lectina de lentilha
m g	Média geométrica
NC	Neurocisticercose
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos

PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-TM	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado
RM	Ressonância magnética
SDS	Sulfato duodecil de sódio
SDS-PAGE	SDS- <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
S MTsa	Extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i>
S MTso	Extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia solium</i>
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia axial computadorizada
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic</i>
Th	Células <i>T helper</i>
Th1	Células <i>T helper</i> tipo 1
Th2	Células <i>T helper</i> tipo 2
Tris	Tris[Hidroximetil]aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
Tween-20	Polioxietilensorbitano-monolaurato
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WB	<i>Western Blotting</i>

1 – INTRODUÇÃO

O complexo Teníase-Cisticercose tem demonstrado relevante impacto em saúde pública, influenciado por fatores demográficos, culturais e políticos, em vários países, inclusive no Brasil (BARBOSA et al., 2000; SCIUTTO et al., 2000; SILVEIRA-LACERDA et al., 2002; PAWLOWSKI, 2008).

A teníase é uma parasitose intestinal decorrente do estágio adulto de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758), ou *Taenia saginata* (Goeze, 1782), cujo habitat é o intestino delgado do homem. Estes parasitos pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestoda, Ordem Cyclophyllidae e Família Taeniidae (REY, 2001).

A informação filogenética é fundamental para compreensão da relação parasito-hospedeiro e a distribuição geográfica do parasito, sendo necessária para obter informações do comportamento do parasito e sua biologia. Neste contexto, a origem e relação entre as espécies *T. solium*, *T. saginata* e *Taenia asiatica* (Eom; Kim, 1993) estão sendo alvo de vários estudos (EOM; KIM, 1993; FAN; CHUNG, 1997; GALAN-PUCHADES; FUENTES, 2000; JEON; KIM; EOM, 2007). Um destes estudos indicou que *T. saginata* e *T. asiatica* são mais próximas filogeneticamente e distanciam-se, no mesmo aspecto, de *T. solium* (JEON; KIM; EOM, 2007).

A biologia e distribuição de *Taenia* sp. tem sido documentado ao longo dos últimos 150 anos, mas a espécie *T. asiatica* foi descoberta e descrita recentemente (EOM; KIM, 1993). Esta espécie, caracterizada pelo homem como hospedeiro definitivo e o suíno como hospedeiro intermediário, tem sido encontrada em diferentes países da Ásia como Taiwan, Indonésia e Coréia (MURREL; CROSS, 1996; FAN; CHUNG, 1997; GALAN-PUCHADES; FUENTES, 2000).

O parasito *T. solium* destaca-se, pois é o responsável pela ocorrência de cisticercose no homem. *T. solium* e *T. saginata* possuem distribuição global, porém são mais comuns em regiões onde há consumo de carne suína e carne bovina, respectivamente (HOBERG, 2002).

1.1 – Aspectos morfológicos de *Taenia solium* e *Taenia saginata*

O estágio adulto de *T. solium* e *T. saginata* apresenta o corpo leitoso, levemente rosado, com comprimento médio de 1,5 a 4 metros, para *T. solium* e podendo atingir até 8 metros em *T. saginata*. O escólex de *T. solium* é piriforme apresentando quatro ventosas e uma dupla coroa de acúleos, com número variando entre 25 a 50, inseridas em um rostro situado entre as ventosas; *T. saginata* não possui rostro. O estróbilo corresponde ao restante do parasito e possui o aspecto de uma fita, sendo formado por vários segmentos, as proglotes, que se desenvolvem a partir do colo. As proglotes apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: proglotes jovens, maduras e grávidas. Decorridos três a quatro meses de infecção, as proglotes grávidas de *T. solium* e *T. saginata* contêm em média 60.000 e 150.000 ovos, respectivamente. As proglotes grávidas são liberadas do estróbilo, em média dois a cinco segmentos, duas a três vezes por semana, sendo eliminadas nas fezes (REY, 2001; GARCIA et al., 2003a). O parasito adulto pode viver de 20 a 25 anos parasitando o homem, aumentando assim a disseminação de ovos pela contaminação de água e alimentos (HOBERG, 2002). No entanto, Garcia et al. (2003a) sugerem um tempo de vida menor, provavelmente menos que cinco anos.

Os ovos, de aproximadamente 30 a 45 μm de diâmetro, são esféricos e de aspecto radial quando observados à luz de microscopia óptica, possuem envoltório denominado embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto, também denominado de oncosfera. Os ovos das duas espécies são idênticos, sendo impossível diferenciar quando examinados com a utilização de microscópio óptico (SCIUTTO et al., 2000). A longevidade e

a alta fecundidade do verme adulto, assim como a alta resistência dos ovos, que podem permanecer viáveis por mais de oito meses em locais quentes e úmidos, aumentam a possibilidade de transmissão (HOBERG, 2002).

As formas metacestódeas constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, com 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, apresentando no seu interior, líquido vesicular e escólex invaginado. A diferenciação da forma metacestódea entre as duas espécies é realizada pela observação do escólex. A forma metacestódea de *T. solium* possui rostro armado com acúleos e a forma metacestódea de *T. saginata* não possui rostro. O líquido vesicular é claro e composto por água, sais minerais, proteínas, uréia, creatinina, ácido úrico, além de colesterol e glicose. Os metacestódeos invaginados podem permanecer assim por mais de 30 anos, embora o tempo médio de vida seja estimado em cinco a sete anos, quando então começam a se degenerar e morrer. Esse fato pode coincidir com a sintomatologia clínica em cerca de 80% dos pacientes, entretanto, algumas pessoas permanecem assintomáticas por toda a vida (SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993; GARCIA et al., 2003a; HAWK et al., 2005).

1.2 – Aspectos biológicos e clínicos

O ciclo biológico das tênia implica dois hospedeiros, um definitivo e um intermediário. O único hospedeiro definitivo de *T. solium* e *T. saginata* na fase adulta é o homem. Os hospedeiros intermediários de *T. solium* são os suínos e os de *T. saginata* são os bovinos. Existem três fases com relação à população e parasitos: adulta no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e formas metacestódeas (fase larval) no hospedeiro intermediário (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

No ciclo natural de *T. solium* e *T. saginata*, suínos e bovinos, respectivamente, se infectam por meio da ingestão de ovos do parasito. Esses 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 no epitélio, encaminhando-se posteriormente para as vênulas, atingindo as veias e os linfáticos mesentéricos, sendo transportado até outros órgãos e tecidos. A oncosfera evolui para formas metacestódeas pequenas e translúcidas (HAWK et al., 2005).

O homem, hospedeiro definitivo, ao ingerir carne crua ou mal cozida de suínos ou bovinos infectados com formas metacestódeas viáveis desenvolve a teníase. No estômago, essas formas metacestódeas sofrem ação do suco gástrico, evaginando-se e fixando-se pelo rostelo na parede do intestino delgado. Após cinco a 12 semanas, desenvolvem-se em parasitos adultos. As proglotes grávidas são eliminadas íntegras pelas fezes, ou rompem-se no interior do cólon, liberando ovos para o exterior. Essa parasitose, no entanto, é pouco patogênica, podendo muitas vezes apresentar-se assintomática (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; GARCIA et al., 2003a). Casos raros de complicações, com obstrução intestinal e necrose intestinal foram relatados (KARANIKAS et al., 2007). Estão principalmente sujeitas à teníase, as pessoas que preparam alimentos e provam a carne antes de cozinhar e indivíduos que se alimentam em lanchonetes e restaurantes. Fatores econômicos, culturais (hábitos alimentares) e religiosos tendem a expor certos grupos de indivíduos em maior ou menor grau. Na culinária tradicional de muitas culturas há pratos que utilizam carne crua, por exemplo, o quibe cru (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

Na cisticercose humana o homem, hospedeiro intermediário acidental de *T. solium*, se infecta pela ingestão de ovos viáveis do parasito. Esse fato pode ocorrer de várias maneiras: (1) por meio da heteroinfecção que consiste na manipulação direta de água ou alimentos contaminados com fezes humanas, ou manipulação indireta através da irrigação e/ou fertilização com água e/ou esterco contaminados; (2) por meio da auto-infecção externa que

consiste na ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio indivíduo portador da teníase, resultado de maus hábitos higiênicos (sobretudo a falta do hábito de lavar as mãos após a defecação); (3) por meio da auto-infecção interna resultante de movimentos antiperistálticos ou de vômitos que permitem o retorno de algumas proglotes ao estômago e aí sofrer a ação do suco digestivo, o que permitirá a eclosão dos embriões infectantes (BARBOSA et al., 2000; REY, 2001; GARCIA et al., 2003a, HAWK et al., 2005). Além destes modos de infecção, há relatos de meios alternativos de transmissão dos ovos de *T. solium* como coprofagia nos psicopatas, pelo ar e por moscas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

O portador de *T. solium* representa uma via de transmissão constante para os que convivem no mesmo domicílio. De acordo com a literatura há casos de cônjuges em que um tinha teníase e o outro cisticercose, reforçando assim a teoria de que a heteroinfecção é a forma de infecção mais comum (REY, 2001). A forma larvária pode atingir os mais variados tecidos humanos incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, sistema nervoso central (SNC) e, raramente, a cavidade oral (VIANNA; MACEDO; COSTA, 1991; ELIAS et al., 2005; PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005; HANDA; GARG; MOHAN, 2008; MITTAL et al., 2008).

No SNC, as formas metacestódeas podem se localizar no parênquima cerebral, espaço subaracnóide, sistema ventricular e medula espinhal, causando a neurocisticercose (NC) (HOBERG, 2002; GARCIA et al., 2003a.; GARG et al., 2008).

A NC tem sido amplamente diagnosticada ao longo dos anos, sendo considerada a enfermidade helmíntica que atinge com maior frequência o SNC, acometendo grande número de pessoas e apresentando, em alguns casos, sintomatologia grave (SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993; BUENO et al., 2000; MACHADO et al., 2002; LIMA et al., 2004; BARCELOS et al., 2007). A sintomatologia não é específica e varia de acordo com número, tamanho, localização e viabilidade das formas metacestódeas, assim como a

resposta imune do hospedeiro (NASH, 2003; HANCOCK et al., 2004, HAWK et al., 2005). O quadro clínico da NC é heterogêneo e inespecífico, podendo ser totalmente assintomático ou se manifestar, inespecificamente, com dor de cabeça, epilepsia, depressão, hipertensão intracranial (SCIUTTO et al., 2000; LIMA et al., 2004; CHAVARRÍA et al., 2005). Em algumas regiões endêmicas, estudos de autopsias demonstraram uma frequência de 43,3% a 91% de indivíduos assintomáticos com NC (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). Essa variação se deve a dificuldade de diagnóstico em indivíduos assintomáticos. Em um estudo realizado em Florianópolis, Rigatti e Trevisol-Bittencourt (1999) constataram que 20% das epilepsias parciais sintomáticas dos pacientes atendidos na Clínica Multidisciplinar de Epilepsia da Policlínica Regional 1/SUS apresentaram como etiologia a cisticercose.

1.3 – Resposta imune na neurocisticercose humana

As células *T helper* (Th) CD4⁺ possuem padrões diferentes de produção de citocinas (Th1 e Th2). As citocinas típicas de Th1 humanas incluem IFN- γ , TNF β e Interleucina (IL) 2, estando envolvidas nas reações inflamatórias mediadas por células. De outra forma as células Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, estimulando a produção de anticorpos. A ação destes dois tipos celulares é antagônica (SEDER; PAUL, 1994).

A atuação desta resposta em NC é base de alguns estudos que demonstraram um perfil inicial de produção de IFN- γ estágio-específico, onde a destruição do parasito pode ser mais efetiva. Após esta fase ocorre aumento na produção de IL-10 estimulado pelo parasito. Sendo assim a resposta imune em NC consiste de uma combinação Th1/Th2, onde há resposta imune do hospedeiro e imunomodulação desta resposta por parte do parasito (TOENJES; KUHN, 2002; BUENO et al., 2004).

Condições inerentes ao hospedeiro e ao parasito podem interferir na resposta imune. O número de cisticercos e seu estágio (viável ou calcificado) influenciam na intensidade da resposta, sendo o grande número de cisticercos viáveis relacionados com resposta imunológica intensa. A idade do hospedeiro está diretamente ligada com a resposta em NC. Hospedeiros muito jovens, com o sistema imune ainda em formação terão uma resposta deficitária, assim como hospedeiros imunossuprimidos (OSTROSKY-ZEICHNER; ESTAÑOL, 1999). Recente estudo visando analisar a resposta sorológica em suínos com cisticercose confirma as evidências em relação à resposta imunológica em humanos. Suínos mais jovens apresentaram maiores níveis de reatividade quando comparados a suínos mais velhos. E a resposta em suínos com cistos múltiplos também foi maior quando comparado a animais com cistos únicos (DECKERS et al., 2008).

1.4 – Epidemiologia e medidas de controle do complexo Teníase-Cisticercose

O homem é o único hospedeiro definitivo de *T. solium*. Os mecanismos de transmissão da cisticercose homem-suíno, homem-homem têm como fator primordial as condições sócio-econômicas e culturais do próprio ser humano. Dentre essas condições destacam-se as sanitárias, incluindo higiene pessoal, contaminação de água e alimentos com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta de *T. solium* (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 (SCIUTTO et al., 2000).

A cisticercose demonstra grande importância clínica nos países em desenvolvimento, principalmente na América Latina, África, Ásia e Índia (FLISSER et al., 2003; ITO;

NAKAO; WANDRA, 2003; MUKARATIRWA et al., 2003; KUMAR, 2004; BUCARDO et al., 2005; MEDINA et al., 2005; PREUX; DRUET-CABANAC, 2005; MONTRESOR; PALMER, 2006; PRABHAKARAN et al., 2008). Nos últimos anos, o intenso fluxo de imigrantes tem sido relacionado com o diagnóstico de casos de NC em países desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos da América (TERRAZA et al., 2001; ROCA et al., 2003; DEGIORGIO et al., 2005).

Estima-se que, anualmente, 50 milhões de pessoas encontram-se infectadas pela cisticercose no mundo, com 50.000 mortes (EDDI; NARI; AMANFU, 2003). Na América Latina, calcula-se que a taxa de prevalência de NC e lesões oculares é de 100 e 30 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, atingindo cerca de 350.000 pessoas (PINTO et al., 2002). A enfermidade foi encontrada em 17 países latino-americanos, sendo as taxas mais elevadas de morbidade as encontradas no Brasil, Chile, Peru, El Salvador, Guatemala e México, tendo maior frequência em áreas rurais (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

Os países do leste da Europa controlaram a teníase e finalmente a erradicaram, através de conscientização social e educação sanitária (GARCIA et al., 2003b). No entanto, existe o risco de reintrodução devido ao aumento do número de imigrantes provenientes de áreas endêmicas (FLISSER et al., 2003; GARCIA et al., 2003a; ITO et al., 2003a; ITO et al. 2003b; PERES et al., 2008). O parasito *T. solium* ainda persiste na América, África e Ásia, onde completa seu ciclo dependendo de vários fatores, dentre eles a saúde pública e a economia, como a falta de saneamento básico, má inspeção sanitária, falta de higiene, falta de educação sanitária à população, dentre outros (EDDI; NARI; AMANFU, 2003; FLISSER et al., 2003; ITO; NAKAO; WANDRA, 2003; ITO et al., 2003a; ITO et al., 2003b). A doença humana causada pela forma metacestódea de *T. solium* mais frequente e grave na América Latina é a forma neurológica da cisticercose.

No Brasil, a cisticercose vem sendo diagnosticada a partir dos serviços de neurologia e neurocirurgia, além de estudos anatomopatológicos (BROTO, 1947; GOBBI et al.; 1980; COSTA-CRUZ et al., 1995; LINO-JÚNIOR; REIS; TEIXEIRA,1999). A ocorrência de cisticercose em 2,9% de pacientes na enfermaria da Clínica Neurológica do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo, foi relatada por Spina-França (1956), enquanto Canelas (1962) encontrou 0,55% em pacientes de ambulatórios e 3,39% na enfermaria do mesmo hospital.

Dados de necropsias realizadas durante 20 anos em indivíduos falecidos em Uberaba-MG apontaram frequência de 2,4% de casos de cisticercose (GOBBI et al., 1980). Em outro estudo retrospectivo nessa cidade, Lino Jr, Reis e Teixeira (1999) relataram a localização cardíaca da cisticercose como a mais freqüentemente encontrada em relação a outros estudos da região. A prevalência de 1,4% de cisticercose humana em necropsias realizadas em Uberlândia-MG foi demonstrada por Costa-Cruz et al. (1995).

A soroprevalência de cisticercose no Brasil, distribuídas por regiões geográficas, foi avaliada por Vianna et al. (1986), em estudo soropidemiológico realizado no Distrito Federal, com indivíduos procedentes de outras regiões, demonstrando ocorrência de 8,1% na região Sudeste, 5,8% no Nordeste, 5,3% no Centro-Oeste e 3,5% na região Sul. A baixa ocorrência de cisticercose em algumas regiões brasileiras pode ser devido à falta de diagnóstico, visto que sob o ponto de vista clínico as manifestações não são características (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; AGAPEJEV, 2003). A literatura nacional disponível não permite afirmar qual região brasileira tem maior prevalência para NC (AGAPEJEV, 2003).

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. Na região Centro-Oeste, Oliveira et al. (2006), em estudo sorológico/epidemiológico, confirmaram a endemicidade da cisticercose humana na cidade de Catalão - Goiás (11,3%).

Estudos realizados com indivíduos de assentamentos e zona rural demonstraram maior ocorrência de cisticercose quando comparados a indivíduos procedentes de áreas urbanas, ressaltando a importância de medidas de controle específicas para essas regiões (BRAGAZZA et al., 2002; GOMES et al., 2002; PRESTES-CARNEIRO et al., 2006).

A cisticercose mostrou-se mais freqüente em idades mais avançadas e os pacientes do sexo feminino são acometidos em maior proporção (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; GARCIA et al., 2003a). Crianças são menos acometidas por neurocisticercose que os adultos, provavelmente pelo seu curto tempo de exposição e/ou sua diferente resposta imunitária. A maioria dos indivíduos infectados tem de 20 a 50 anos de idade (SCIUTTO et al., 2000; HOBERG, 2002).

As medidas de controle para a teníase e a cisticercose consistem na interrupção do ciclo de vida do parasito, incluindo saneamento básico, tratamento de portadores de teníase, eliminação da prática de alimentação dos suínos com materiais contaminados e dejetos humanos, irrigação com água adequada; promoção de inspeção sanitária aos abatedouros de suínos, prática do cozimento adequado da carne de suínos, promoção da educação sanitária da população, pelo aperfeiçoamento de hábitos elementares, como lavar as mãos antes de se alimentar, preparar alimentos e após utilizar o banheiro (SCIUTTO et al., 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; HOBERG, 2002; GONZALEZ et al., 2003; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003; MONTRESOR; PALMER, 2006; NGOWI et al., 2008).

Vários estudos demonstraram a aplicação eficaz de vacina animal, com futura perspectiva de medida profilática visando acessibilidade e fácil aplicação (TOLEDO et al.,

2001; VERASTEGUI et al., 2002; LIGHTOWLERS, 2003; EDDI et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2007; CAI et al., 2008; SCIUTTO et al., 2008).

A aplicação de medidas de controle da teníase/cisticercose depende das características epidemiológicas da enfermidade na região, incluindo condições econômicas, sociais e culturais (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000). Todas essas medidas são sabidamente eficazes e quando realizadas em conjunto, promoverão um efetivo bloqueio na propagação de teníase e cisticercose, além de reduzir a ocorrência de outras doenças humanas de transmissão fecal-oral (NASH, 2003; EDDI et al., 2006; NGOWI et al., 2008; PAWLOWSKI, 2008).

A notificação compulsória pode fornecer dados epidemiológicos mais precisos sobre a prevalência populacional e permitir o mapeamento geográfico das áreas mais afetadas para melhor direcionamento das medidas preventivas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001). Embora o Ministério da Saúde recomende a implementação da notificação compulsória do complexo teníase-cisticercose, somente os Estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e a localidade de Ribeirão Preto (SP) implantaram programas de controle da teníase-cisticercose (AGAPEJEV, 2003).

A colaboração internacional constitui uma das mais importantes ferramentas para o controle da cisticercose humana. O intercâmbio de resultados obtidos por grupos de pesquisa de todo mundo auxilia na compreensão dos melhores métodos de diagnóstico, tratamento e conseqüentemente, no controle da cisticercose humana (SCHANTZ, 2006).

O controle ainda continua sendo a forma mais eficaz de combater os efeitos da cisticercose humana, uma vez que a eficácia do tratamento é contraditória, mostrando bons resultados em pacientes com lesões císticas únicas e quando o tratamento é iniciado precocemente (HUSAIN et al., 2008; THUSSU et al., 2008).

1.5 – Diagnóstico da cisticercose humana

O diagnóstico da cisticercose em função de seu pleomorfismo é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (DEL BRUTO et al., 1996). O diagnóstico clínico da cisticercose é difícil de ser realizado em pacientes assintomáticos, estando associado nos sintomáticos, às alterações fisiológicas provocadas pela localização das formas metacestódeas. No caso da NC nem sempre é fácil devido ao polimorfismo das manifestações neurológicas comuns a outras doenças do SNC (GARCIA et al., 2005; HAWK et al., 2005; YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005).

O diagnóstico laboratorial compreende a pesquisa direta do parasito, por meio de exames anatomopatológicos após intervenção cirúrgica, biópsia ou necropsia. Compreendem também exames por imagem através de tomografia axial computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) que podem evidenciar o número e tamanho das lesões, a regressão da infecção e o nível da reação inflamatória do hospedeiro contra o parasito. No entanto a TC e a RM algumas vezes não permitem o diagnóstico diferencial com outras infecções ou neoplasia do SNC (SCIUTTO et al., 2000; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; PRETELL et al., 2005; GARG et al., 2008).

O imunodiagnóstico da cisticercose humana constitui o diagnóstico indireto da infecção pela detecção de anticorpos contra antígenos da forma metacestódea de *T. solium*, em amostras de soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva ou sangue em papel de filtro e alcançando quase sempre papel central no diagnóstico da NC (COSTA, 1986). Dentre os testes imunológicos destacam-se:

- ❖ Reação de Fixação de Complemento (RFC) – Testado inicialmente por Weinberg (1909), porém sem resultados promissores. Moses (1911) detectou pela primeira vez a presença de anticorpos específicos no soro e LCR. No entanto, deve-se a Lange (1936) a introdução da RFC para cisticercose na rotina do exame de LCR.

- ❖ Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI) – é uma técnica rápida, de fácil execução e baixo custo. Entretanto, faz-se necessário, a uniformização do método de preparo de antígenos empregados para proceder a comparações entre os resultados observados (COSTA, 1986). Essa técnica é mais sensível que a fixação de complemento, mas pode ocorrer grande frequência de resultados falso-positivos (FERREIRA et al., 1997).
- ❖ Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) – Foi padronizada por Machado; Camargo; Hoshino (1973) para ensaio em amostras de soro e LCR, empregando partículas deslipidizadas de forma metacestódea de *T. solium* como antígeno. A reação apresenta boa sensibilidade e especificidade, contribuindo para o estudo imunológico da NC humana (LIVRAMENTO, 1981; VIANNA et al., 1992).
- ❖ *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) - A reação imunoenzimática foi inicialmente aplicada no diagnóstico de cisticercose por Arambulo et al. (1978), com utilização de extrato salino deslipidizado de *T. solium* adulta e de cisticerco como antígeno. A introdução desta técnica promoveu um grande avanço no diagnóstico da cisticercose, devido à alta sensibilidade, especificidade e reprodutividade, características que tornaram este o teste mais utilizado nos países em desenvolvimento (DORNY et al., 2003). A padronização desse teste no Brasil teve início com o trabalho de Costa et al. (1982) em amostras de LCR. A utilização do teste ELISA na detecção de diferentes tipos de anticorpos constitui uma importante ferramenta no imunodiagnóstico da NC humana utilizando amostras de soro ou LCR (LIVRAMENTO et al., 1985; BUENO et al., 2000; MACHADO et al., 2002)
- ❖ *Immunoblotting* (*Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay* - EITB) – Foi padronizado por Tsang; Brand; Boyer (1989). Apesar de terem sido observados diferentes níveis de sensibilidade e eficiência, os quais estão relacionados com a

preparação antigênica, a gravidade das lesões e a reação inflamatória que envolve o parasito, este teste tem sido considerado o mais específico (DORNY et al., 2003). A utilização de *Immunoblotting* em amostras de LCR também tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade nos estudos realizados (VAZ et al., 1997; BARCELOS et al., 2001; SUZUKI et al., 2007).

Um novo método de diagnóstico da NC humana baseado na transformação de linfócitos foi descrito por Prasad et al. (2008). Culturas de linfócitos foram colocadas em contato com LCR humano e as modificações observadas para definir o diagnóstico que apresentou sensibilidade e especificidade altas (93,8% e 96,2%, respectivamente).

O diagnóstico da NC em amostras de LCR foi realizado recentemente com a utilização da técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), onde o DNA de *T. solium* foi encontrado em 96,7% das amostras testadas (ALMEIDA et al., 2006a).

A detecção de antígenos também é utilizada para o diagnóstico da cisticercose (NGUEKAM et al., 2003; DORNY; BRANDT; GEERTS, 2004; ITO; CRAIG, 2004). O teste ELISA para detecção de antígenos é uma ferramenta eficiente para o acompanhamento do tratamento de pacientes com NC, pois o antígeno circulante não é mais detectado no soro de pacientes curados após 1 a 3 meses de tratamento (DORNY; BRANDT; GEERTS, 2004). No entanto não há evidências de que o teste ELISA para detecção de antígenos seja melhor que o teste ELISA para detecção de anticorpos (ITO; CRAIG, 2004).

Parija et al. (2004) utilizaram o teste de co-aglutinação para detecção de antígenos de metacestódeos de *T. solium* na urina de pacientes com NC, encontrando sensibilidade e especificidade moderadas. O mesmo teste apresentou resultados semelhantes utilizando amostras de LCR humano (PARIJA; SAHU; DHANYA, 2007).

Utilizando extrato salino total e líquido de vesícula das formas metacestódeas de *T. solium*, Shiguekawa et al. (2000) realizaram o teste *Western Blotting* (WB) em 80 amostras de

soro humano. Reconheceram a proteína de 80 kDa, sugerindo que este epítipo poderia ser considerado como um marcador comum de parasitoses intestinais, além das proteínas de 24, 39-42, 47-52, 56, 64-68, 126-155 kDa para extrato salino e 18, 24, 26-28, 32-36, 47-52, 75 kDa para líquido de vesícula. Todos os marcadores moleculares reconhecidos já foram descritos na literatura sendo estes marcadores imunodominantes de alta especificidade, porém de baixa sensibilidade. Barcelos et al. (2007) identificaram as proteínas de 47-52, 64-68 e 70 kDa utilizando extrato salino total de formas metacestódeas de *T. solium* na reação de WB, diferenciando formas ativas e inativas de NC humana.

1.6 – Interações lectina-carboidrato

As lectinas representam uma classe de glicoproteínas de origem não imune que se ligam especificamente aos carboidratos, com capacidade de aglutinar células ou precipitar conjugados (LIS; SHARON, 1986).

Foi demonstrado que estas proteínas não estão presentes apenas nas plantas, mas estão distribuídas ubiqüamente na natureza, presentes frequentemente na superfície de células, onde estão estrategicamente posicionadas para se ligar com carboidratos das células vizinhas (SHARON, 1983; LIS; SHARON, 1986).

A maioria das lectinas reconhece e se liga a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina ou fucose (SILVA; SILVA, 2000). Além de serem específicas, elas se ligam de forma reversível às moléculas às quais possuem afinidade, fato este que possibilita a sua aplicação na área biológica e médica tais como: investigação da superfície de células, caracterização de eritrócitos, como agentes mitogênicos, caracterização de estádios de desenvolvimento de microorganismos e purificação de glicoproteínas. (LIS; SHARON, 1986; VARKI et al., 1999; GENNARI-CARDOSO, 2000; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003; JIANG et al., 2007; YU et al., 2007).

A lectina extraída de sementes da jaca ou “jackfruit” (*Artocarpus integrifolia*), conhecida como jacalina vem sendo muito estudada na área biológica. Possui uma porção N-terminal específica para a galactose além de possuir sítios hidrofóbicos e hidrofílicos. Embora possua sítios com afinidade para manose, estes são 20 vezes mais fracos que aqueles com afinidade para a galactose. Esta mesma fruta possui outra lectina chamada de KM+ ou artocarpim, é ligante de manose e está presente em menor quantidade em comparação à jacalina (ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985; SASTRY et al., 1986; KABIR, 1998; WU et al., 2003; AROCKIA et al., 2005; TRINDADE et al., 2006).

A Concanavalina A (ConA) é uma lectina extraída do feijão-de-porco ou “jack bean” (*Canavalia ensiformis*), leguminosa da família Phaseoleae, ligante de manose. Esta lectina foi a primeira lectina de leguminosa a ser isolada, seqüenciada e analisada quanto à estrutura tridimensional por cristalografia (SUMNER; HOWELL, 1936; EDELMAN et al., 1972; CUNNINGHAM et al., 1975) sendo atualmente uma das mais aplicadas em diferentes áreas da biologia (NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003; JIANG et al., 2007; YU et al., 2007).

A N-acetil-glicosamina é uma lectina ligante de quitina que tem sido isolada de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos. Estruturalmente possui um anel que exibe forte interação hidrofóbica. Esta lectina tem sido bastante estudada devido à sua característica antifúngica, uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular dos fungos (HUANG; XIE; GONG, 2000; CAMPOS-OLIVAS et al., 2001; STOEVA et al., 2001).

1.7 – Utilização de glicoproteínas no diagnóstico da cisticercose humana

Muitas células possuem açúcares ligados covalentemente às proteínas de membrana e aos lipídios da bicamada lipídica da membrana plasmática, originando assim as glicoproteínas e os glicolipídios, respectivamente. As glicoproteínas e os glicolipídios auxiliam na proteção celular, no movimento de células móveis e exercem o importante papel de reconhecimento e

adesão celular. Devido a essa capacidade, algumas proteínas, como as lectinas, são especializadas em reconhecer cadeias laterais de oligossacarídeos (açúcares) e ligar-se a elas (DOOLITTLE, 1985).

Antígenos utilizados no diagnóstico da cisticercose humana, com massa molecular de 14, 18, 21, 24 e 39-42 kDa, são todos membros da família de proteínas conhecida como antígenos de 8 kDa. Alguns destes antígenos de 8 kDa apresentam alta sensibilidade e especificidade, sendo úteis no diagnóstico sorológico da cisticercose humana (HANCOCK et al., 2003). Em recente estudo Iudici-Neto et al. (2007) confirmaram a especificidade da proteína de aproximadamente 26 kDa no imunodiagnóstico da NC humana.

Nas interações parasito-hospedeiro que ocorrem durante a infecção com metacestódeos de *T. solium*, está claro que as proteínas de 8 kDa estão relacionadas com a resposta imune no diagnóstico da cisticercose. Com o intuito de determinar quais das proteínas pertencentes à família de 8 kDa são melhores marcadores antigênicos no diagnóstico da cisticercose, Hancock et al. (2003) sintetizaram e avaliaram essas proteínas no ELISA. A proteína TsRS1 apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

GP50, uma proteína de *T. solium* utilizada no diagnóstico da cisticercose, foi clonada, seqüenciada e caracterizada (HANCOCK et al., 2004). GP50 é outro membro dos antígenos LLGP que tem sido utilizado no diagnóstico da cisticercose humana baseada na detecção de anticorpos pelo EITB. Esta glicoproteína é uma proteína de membrana GPI-ancorada (glicosil-fosfatidil-inositol). A proteína nativa tem massa molecular de 50 kDa, porém a massa molecular preditiva da proteína é 28,9 kDa, sendo esta visualizada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e em reações de WB (GARCIA et al., 2005).

Em um estudo com peptídeos sintéticos e recombinantes, Bueno et al. (2005) analisaram dois antígenos derivados de LLGP, TS18var1 sintético e GP50 recombinante, no ELISA utilizando amostras de soro e liquor. A sensibilidade encontrada no soro e no liquor

foi de 94,7% e 100% utilizando GP50 recombinante e de 90,4% e 90,2% utilizando TS18var1 sintético, respectivamente. A especificidade encontrada no soro e liquor foi de 93,8% e 100% utilizando GP50 e de 90,3% e 98,0% utilizando TS18var1 sintético, respectivamente.

Ao caracterizarem os carboidratos constituintes das glicoproteínas de metacésteos de *T. solium*, Restrepo et al. (2000) realizaram o WB com diferentes lectinas, entre elas a jacalina. Na reação com a jacalina houve o reconhecimento das bandas de 28,9 kDa (GP50) e das bandas de 14, 18 e 24 kDa (8kDa), sugerindo portanto que a jacalina apresenta a mesma afinidade glicoproteica da lentilha.

1.8 – Utilização de antígenos alternativos no diagnóstico da cisticercose humana

Os avanços no diagnóstico sorológico da NC consistem na identificação e síntese de antígenos específicos para se obter ensaios com alta sensibilidade e técnicas de fácil reprodutibilidade que não dependam do suprimento contínuo de parasito para preparo antigênico (GARCIA et al., 2005).

Antígenos de metacésteos de *Taenia crassiceps* substituem eficientemente os antígenos de parasitos suínos no imunodiagnóstico da NC (LARRALDE et al., 1989; VAZ; NUNES; PIAZZA, 1997). Barcelos et al. (2001) padronizaram o teste “Western Blotting” em 50 amostras de LCR utilizando quatro extratos antigênicos: extratos salinos das formas metacésteas de *T. solium* (homólogo) e *T. crassiceps* (heterólogo); extratos sulfato de duodecil de sódio (SDS) homólogo e heterólogo. Reconheceram 15 bandas de pesos moleculares aparentes, das quais 11 já haviam sido descritas na literatura, como a banda 8 kDa descrita juntamente com a banda de 26 kDa por Gottstein; Tsang; Schantz (1986), as bandas de pesos moleculares de 12-13, 18, 24, e 39-42 kDa que correspondem a quatro das sete glicoproteínas 50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13 kDa purificadas por Tsang; Brand; Boyer (1989).

O líquido de vesícula, assim como o antígeno total, de *T. crassiceps* demonstrou sensibilidade e especificidade satisfatórias na detecção de anticorpos no líquido humano utilizando o teste ELISA quando comparado ao antígeno homólogo (SUZUKI et al., 2007).

A utilização de proglotes de forma adulta de *T. saginata* como antígeno heterólogo no teste ELISA para o diagnóstico da NC humana foi utilizado pela primeira vez por Morakote et al. (1992). Apesar de apresentar baixa sensibilidade e baixa especificidade, os resultados encontrados neste trabalho sugeriram a futura utilização de outras formas evolutivas de *T. saginata* no diagnóstico da NC humana.

Peptídeos sintéticos baseados em proteínas imunogênicas da oncosfera de *T. saginata* e de *T. solium* foram utilizados no diagnóstico da cisticercose bovina e suína, respectivamente, demonstrando bom desempenho (FERRER et al., 2003; FERRER et al., 2007). Peptídeos sintéticos, também baseados em seqüências antigênicas de proteínas da oncosfera de *T. saginata* demonstraram alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium* no líquido (FLEURY et al., 2003).

O estudo de antígenos alternativos para o imunodiagnóstico da NC faz-se necessário para o conhecimento de casos isolados da doença em países não-endêmicos e em regiões onde a coleta de metacestódeos de *T. solium* é difícil (FLEURY et al., 2003). A inviabilidade na obtenção de metacestódeos de *T. solium* é um problema já relatado por outros autores (BRAGAZZA et al., 2002; FLEURY et al., 2003).

A cisticercose bovina demonstra alta prevalência atualmente (ABUNNA et al., 2008). No Brasil, a obtenção de metacestódeos de *T. saginata* é facilitada, uma vez que já foram relatadas prevalências da cisticercose bovina nas seguintes localidades: Paraná – 2,79% (ZAMPIM, 1994); Tupã, SP – 10,7% (MANHOSA, 1996); Mato Grosso do Sul – 1,04% (CARMO; OLIVEIRA; BANDINI, 1997). No Rio Grande do Sul a cisticercose bovina é a

principal causa de retenção de carcaças em matadouros-frigoríficos sob inspeção federal (RODRIGUES, 1993).

Na região do presente estudo a facilidade na obtenção de metacestódeos de *T. saginata* se encontra no fato de a cisticercose bovina ser a principal causa de condenação de bovinos abatidos em frigoríficos de Minas Gerais sujeitos a inspeção federal (QUEIROZ et al., 2000). No município de Uberlândia no ano de 1999, a prevalência de cisticercose bovina foi de 4% em frigoríficos de inspeção federal e de 10% nos matadouros municipais (ALMEIDA et al., 2002).

Oliveira et al. (2007) avaliaram a utilização de metacestódeos de *T. saginata* como antígeno alternativo no diagnóstico sorológico da NC humana. Foram utilizados os testes IFI, ELISA e WB que apresentaram sensibilidade de 85%, 95% e 95% e 75%, 80% e 85% utilizando como antígeno, respectivamente, metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata*. A especificidade dos três testes utilizando antígeno de metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata* foi de 95%, 89% e 94% e 96%, 89% e 94%, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os antígenos de metacestódeos das duas espécies, demonstrando que o metacestódeo de *T. saginata* pode ser utilizado como antígeno alternativo no diagnóstico da NC humana. No referido estudo foi observada reatividade cruzada quando soro de indivíduos infectados por *Echinococcus granulosus* foram testados pelos testes IFI, ELISA e WB, com os antígenos de metacestódeos de *T. solium* e *T. saginata*. A reatividade cruzada encontrada entre *Taenia* sp. e *Echinococcus granulosus* também foi demonstrada em outros estudos (ISHIDA et al., 2003; GEKELER et al., 2002).

A purificação antigênica para o diagnóstico da NC utilizando líquido como material biológico também se faz necessária uma vez que foi demonstrado que alguns componentes no líquido podem influenciar no diagnóstico da NC (CASANOVA et al., 2006). No entanto

alguns métodos de purificação antigênica podem favorecer a especificidade dos testes sorológicos (TSANG; BRAND; BOYER, 1989).

A utilização de LCR no diagnóstico sorológico tem sido demonstrada em alguns estudos com bons níveis de sensibilidade e especificidade, utilizando antígenos homólogos e heterólogos (BARCELOS et al., 2007; SUZUKI et al., 2007). No entanto, até o momento não foram descritos dados sobre a utilização de extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* nos testes ELISA e *Immunoblotting* em LCR humano.

O teste padrão para detecção de anticorpos específicos anti-metacestódeos de *T. solium* é o WB utilizando LLGP (TSANG; BRAND; BOYER, 1989). Este é o único teste reconhecido pela Organização Mundial de Saúde e pela Organização Pan-Americana de Saúde para o diagnóstico da cisticercose humana (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1997). Tsang, Brand e Boyer (1989) demonstraram que o WB utilizando LLGP foi 100% específico, inclusive se tratando de pacientes infectados por *E. granulosus*.

O reconhecimento na reação de *Immunoblotting* utilizando extrato salino de metacestódeo de *T. solium* e de *T. saginata* demonstrou padrões diferentes para cada antígeno (OLIVEIRA et al., 2007). A característica de reconhecimento é estágio-específico e não espécie-específico, sugerindo a presença de glicoproteínas distintas, mas com reatividade cruzada, entre as formas císticas das infecções parasitárias.

Diante da necessidade de utilização de antígenos alternativos para o diagnóstico da neurocisticercose humana em testes sensíveis e específicos, o fracionamento destes antígenos consiste em uma importante ferramenta para que o diagnóstico da cisticercose humana continue sendo realizado mesmo na ausência do antígeno homólogo.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

- ✓ Avaliar o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de afinidade como antígeno alternativo no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Fracionar o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* por cromatografia de afinidade em colunas de Agarose®-Jacalina, Agarose®-Concanavalina A e Agarose®-N-acetil-glicosamina;
- ✓ Analisar o perfil eletroforético das frações antigênicas obtidas em SDS-PAGE 12 % pela coloração do gel por nitrato de prata;
- ✓ Comparar o potencial antigênico dos extratos e das frações obtidas em amostras de soro humano pelos testes ELISA e *immunoblotting*;
- ✓ Avaliar a utilização de antígeno heterólogo obtido de metacestódeos de *T. saginata* e frações antigênicas na detecção de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de líquido humano pelos testes ELISA e *immunoblotting*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU 146/2005).

3.2 – Procedência das amostras biológicas

3.2.1 - Procedência das amostras de soro

As amostras biológicas de pacientes com NC e de indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp., foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia, MG. Amostras de sangue foram colhidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU por punção venosa e enviadas para o Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, onde as amostras de soro foram obtidas através de centrifugação. Estas amostras foram divididas em alíquotas de 500µL em tubos de “Eppendorf”, conservadas, volume/volume, em glicerina PA (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) identificadas e conservadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras dos indivíduos saudáveis foram obtidas de membros da comunidade que consentiram em participar do estudo. As amostras foram colhidas no próprio Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU. As amostras de soro foram divididas em alíquotas de 500µL em tubos de “Eppendorf”, conservadas, volume/volume, em glicerina PA (Merck) identificadas e conservadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras de soro controle positivo foram obtidas de dois pacientes com diagnóstico confirmado de NC através de TC, LCR e soro positivos no ELISA para cisticercose, história clínica e dados epidemiológicos do paciente.

As amostras de soro controle negativo foram obtidas de três indivíduos aparentemente saudáveis, que em três exames parasitológicos de fezes pelo método de Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934) foram negativos para *Taenia* sp e demais parasitos intestinais. Além disto, esses indivíduos possuíam sorologia negativos para cisticercose e ausência de história anterior de teníase-cisticercose.

3.2.2 - Procedência das amostras de líquido cefalorraquidiano

As amostras de LCR de pacientes com NC foram obtidas por meio da alíquota que seria desprezada, após os exames de rotina, pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. Estas amostras provieram de pacientes distintos dos pacientes com NC doadores de soro. As amostras de LCR foram divididas em alíquotas de 500µL em tubos de “Eppendorf”, identificadas e conservadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras de LCR de pacientes com outras manifestações neurológicas foram obtidas por meio da alíquota que seria desprezada, após os exames de rotina, pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. Estas amostras foram divididas em alíquotas de 500µL em tubos de “Eppendorf”, identificadas e conservadas a -20°C até o momento do uso.

3.3 – Amostras de soro

Foram obtidas 142 amostras de soro, divididas em três grupos: pacientes com neurocisticercose (Grupo 1); indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (Grupo 2) e indivíduos saudáveis (Grupo 3).

3.3.1 - Amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (Grupo 1)

Foram obtidas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose, de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (1996).

Todos apresentavam pelo menos uma manifestação clínica sugestiva de NC: epilepsia (55%), cefaléia (50%), tonturas (27,5%), demência (12,5%), desmaios (10%), hidrocefalia (2,5%) e ausência de sinais ou sintomas de cisticercose em outros órgãos.

Todos os pacientes eram provenientes ou residiam em áreas endêmicas e pelo menos dois deles relataram contato com portadores de *T. solium*.

Todos os pacientes apresentavam ELISA positivo para anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no LCR utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*.

Todos os pacientes possuíam evidências de metacestódeos em exames de neuroimagem, sendo classificados de acordo com a viabilidade dos metacestódeos: vesicular (8/40; 20%), vesicular/calcificada (15/40; 37,5%) e calcificada (17/40; 42,5%), de acordo com Sotelo; Guerrero; Rubio (1985).

Dezoito (45%) pacientes eram do sexo feminino e 22 (55%) eram do sexo masculino, sendo a mediana das idades de 36,5 anos (variando de 10 a 60 anos).

3.3.2 - Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp (Grupo 2)

Com o objetivo de verificar reatividade cruzada nos métodos imunológicos, como já relatado por alguns autores (LARRALDE *et al.*, 1989; MONTENEGRO *et al.*, 1994), foram obtidas 62 amostras de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp., assim distribuídos: Ancilostomídeos (n=6), *Ascaris lumbricoides* (Linneu, 1758) (n=6), *Enterobius vermicularis* (Linneu, 1758) (n=6), *Giardia lamblia* (Anton Van Leeuwenhoek, 1681) (n=4), *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) (n=4), *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) (n=4), *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) (n=10), *Trichuris trichiura* (Linneu, 1771) (n=2), *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) (n=10), *Taenia* sp. (Linneu, 1758) (n=10).

Os dados referentes ao sexo e idade não foram acessíveis em 18 (29%) destes pacientes, que constituíram de 10 amostras de pacientes infectados por *E. granulosus* (amostras provenientes do Laboratório Central de Porto Alegre) e 8 amostras de pacientes infectados por *S. mansoni* (amostras provenientes do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia). Entre os pacientes do Grupo 2, em que foram acessíveis os dados quanto ao sexo e idade, 25 (56,8%) pertenciam ao sexo feminino e 19 (43,2%) ao sexo masculino e a mediana das idades foi de 22,5 anos (variando de 7 a 70 anos).

3.3.3 - Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis (Grupo 3)

Foram obtidas 40 amostras de soro de indivíduos assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934) foram negativos para parasitos intestinais. Estes indivíduos apresentaram sorologia negativa para NC utilizando extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* e negaram história anterior de teníase/cisticercose. Vinte e quatro (60%) pertenciam ao sexo feminino e

16 (40%) ao sexo masculino. Nesses indivíduos a mediana das idades foi de 24 anos (variando de 2 a 66 anos).

3.4 – Amostras de líquido cefalorraquidiano

Foram obtidas 70 amostras de LCR, divididas em dois grupos: pacientes com neurocisticercose (Grupo 4) e pacientes com outras manifestações neurológicas (Grupo 5).

3.4.1 - Amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocisticercose (Grupo 4)

Foram obtidas 35 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (1996) (Quadro 1). Entre os pacientes do Grupo 4, 21 (60%) pertenciam ao sexo feminino e 14 (40%) ao sexo masculino e a mediana das idades foi de 24 anos (variando de 17 a 62 anos).

3.4.2 - Amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com outras manifestações neurológicas (Grupo 5)

Foram obtidas 35 amostras de LCR de pacientes com outras manifestações neurológicas que apresentavam neuroimagem e sorologia (teste ELISA no LCR) negativos para neurocisticercose. As desordens neurológicas avaliadas neste grupo foram: cefaléia (42,7%), parestesia (20,0%), crise convulsiva (8,7%), meningite (17,2%), tumor (5,7%) e esclerose múltipla (5,7%). Dezoito (51,4%) indivíduos pertenciam ao sexo feminino e 17 (48,6%) ao sexo masculino. Nesses indivíduos a mediana das idades foi de 27 anos (variando de 19 a 56 anos).

3.5 – Obtenção das formas metacestódeas de *T. solium* e *T. saginata*

Os metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata* encontravam-se disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, onde foi desenvolvido este estudo. Os

metacestódeos de *T. solium* foram obtidos de músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados. Os músculos dos suínos infectados foram acondicionados em caixas de isopor sob 4°C e levados para o Laboratório e os metacestódeos retirados por dissecação, lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) e armazenados a -70 °C.

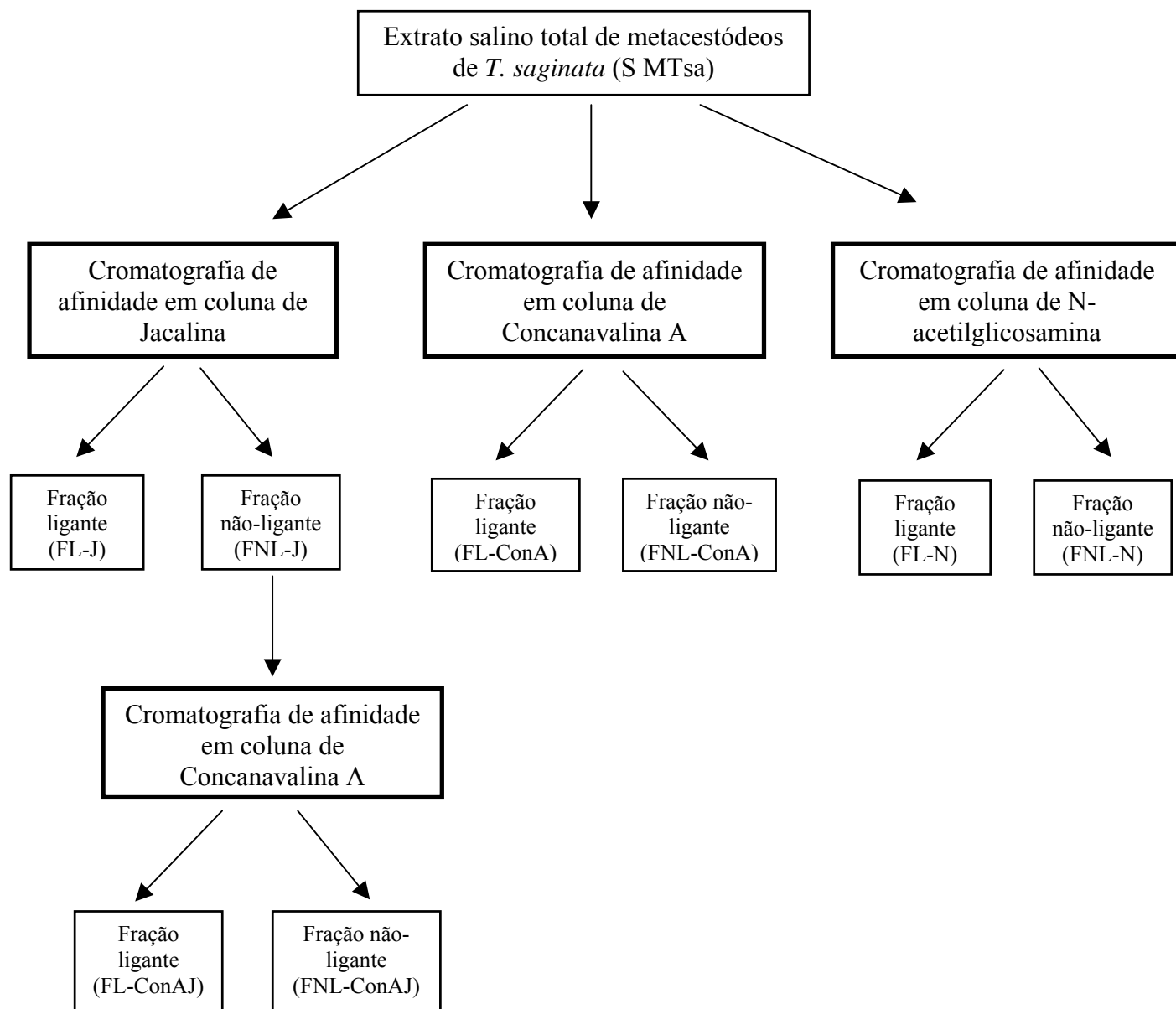
Os metacestódeos de *T. saginata* foram obtidos de músculos esqueléticos de bovinos naturalmente infectados. Os músculos infectados foram doados por um dos frigoríficos da região. Os metacestódeos foram retirados por dissecação, lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) e armazenados a -70 °C.

3.6 – Extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium* e *T. saginata*

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata*, respectivamente, para o preparo destes extratos, de acordo com Costa (1986). Para cada extrato, os metacestódeos foram ressuspensos em 5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col[®], USA), a 4°C por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento com ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica São Paulo, Brasil) a 40 kHz por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonzificação com 5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi incubada 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 salino total. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma Chemical Co, St. Louis-MO, USA).

3.7 – Fracionamento dos extratos antigênicos por cromatografia de afinidade

Com o intuito de avaliar as diferentes frações antigênicas do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*, as cromatografias de afinidade foram realizadas de acordo com o fluxograma abaixo.



3.7.1 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Jacalina do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*

A cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. Foram aplicados 4 mL do extrato S MTsa, contendo 12 mg de proteína total, em coluna com leito de 5mL de agarose®-Jacalina (Sigma) equilibrada com solução tamponada com fosfato (PBS 0,01M pH 7,2). A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente, a coluna foi lavada com PBS para obtenção da fração não ligante de jacalina (FNL-J). Frações de 2 mL do eluato-PBS foram coletadas e submetidas à leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS acrescido de 0,4M de D-+-Galactose (Sigma) constituindo a fração ligante de jacalina (FL-J). Frações de 2 mL do eluato D-+-Galactose, foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida sódica (Sigma) 0,02% em PBS. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-J e outro para a FL-J. Estas amostras foram concentradas em aparelho Amicon (Stirred Ultrafiltration Cells, Millipore, USA), membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-J foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o seu volume inicial e posteriormente concentrada para um volume aproximado de 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

3.7.2 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Concanavalina A do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*

Para obtenção de frações ligantes e não ligantes de ConA a cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. A resina de ConA-Agarose foi empacotada através de fluxo lento com 20 vezes o seu volume de PBS 0,01M (pH 7,2). Para evitar uma possível clivagem da ligação entre a ConA e a matriz Agarose, foi realizada uma ligação cruzada com glutaraldeído, de acordo com protocolo descrito por Scher, Resneck, Bloch (1989), com algumas modificações. A resina foi lavada com 50 mL de Trietanolamina (Triethylamine 99%, Acros, Bélgica) pH 6,2. Esta solução constituiu de 2,7 mL de Trietanolamina em 100 mL de PBS, lembrando que o pH desta solução foi ajustado antes de completar o volume final de 100 mL com PBS. Aos 50 mL restantes de Trietanolamina pH 6,2 foi acrescentado Methyl- α -D-manopiranosídeo 0,2 M que em seguida foi utilizada para lavar a coluna. O fluxo foi interrompido deixando um volume de 5 mL da solução utilizada na etapa anterior acima do nível da resina. Esta solução foi necessária para homogeneizar 150 μ L de glutaraldeído (25%) na resina e possibilitar a agitação da mesma, que foi realizada em intervalos de 10 minutos por uma hora a temperatura ambiente. Após este intervalo a coluna foi lavada com 25 mL de glicina (glicina 1M + Tris HCl 1M pH 9,2 + Metil- α -D-manopiranosídeo) e posteriormente lavada com 25 mL de glicina 1M (Tris-HCl 1M pH 9,2), sendo agitada a cada dois minutos com auxílio de uma pipeta Pasteur. A última etapa antes da adição da amostra constituiu da lavagem da coluna com 20 vezes o seu volume em PBS.

Foram aplicados 4 mL de S MTsa contendo 12 mg de proteína, em coluna com leite de 5mL de ConA. A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS 0,01M (pH 7,2) para obtenção da fração não ligante de ConA (FNL-ConA). Frações de 2 mL foram coletadas e submetidas à leitura de DO em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material

adsorvido à coluna foi eluído com PBS 0,01M (pH 7,2) acrescido de Metil- α -D-manopiranosídeo 0,2 M (Fluka, Biochemika, USA) para obtenção da fração ligante de ConA (FL-ConA). Frações de 2 mL foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida sódica 0,02%. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-ConA e outro para a FL-ConA. Estas amostras foram concentradas em Amicon utilizando membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-ConA foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o volume inicial. Após a diálise o material foi concentrado para um volume aproximado de 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

3.7.3 – Cromatografia em coluna de Agarose®-Concanalina A da fração não-ligante de Jacalina (FNL-J)

Para obtenção de frações ligantes e não ligantes de ConA a cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com o item 3.5.2.

Foram aplicados 6 mL da FNL-J contendo 10 mg de proteína, em coluna com leito de 5mL de ConA. A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS 0,01M (pH 7,2) para obtenção da fração não ligante de ConA (FNL-ConAJ). Frações de 2 mL foram coletadas e submetidas à leitura de DO em espectrofotômetro a 280nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS 0,01M (pH 7,2) acrescido de de Metil- α -D-

manopiranosídeo 0,2 M para obtenção da fração ligante de ConA (FL-ConAJ). Frações de 2 mL foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida sódica 0,02%. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-ConAJ e outro para a FL-ConAJ. Estas amostras foram concentradas em Amicon utilizando membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-ConAJ foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o volume inicial. Após a diálise o material foi concentrado para um volume aproximado de 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

3.7.4 – Cromatografia em coluna de Agarose®-N-acetil-glicosamina do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*

A cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com Hermanson, Mattson, Krohn (1995) com algumas modificações. Foram aplicados 3 mL do extrato S MTsa, contendo 12 mg de proteína total, em coluna com leito de 5mL de Agarose®-N-acetil-glicosamina (Sigma) equilibrada com PBS 0,01M (pH 7,2). A preparação permaneceu incubada por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente a coluna foi lavada com PBS para obtenção da fração não ligante de N-acetil (FNL-N). Frações de 2 mL do eluato-PBS foram coletadas e submetidas à leitura de DO em espectrofotômetro a 280 nm, até uma leitura inferior a 0,02. O material adsorvido à coluna foi eluído com PBS acrescido de 0,4 M de D+-Glucose (Fluka) constituindo a fração ligante de N-acetil (FL-N). Frações de 2

mL do eluato D-+-Glucose foram coletadas e monitoradas pela leitura da DO até obtenção de um valor próximo de zero.

Após a obtenção dos eluatos a coluna foi lavada com um volume de 100 mL de PBS e o gel foi embebido em um volume de 10 mL de azida sódica 0,02% em PBS. A coluna foi vedada com parafilme e armazenada a 4 °C.

As frações que apresentaram os maiores valores de DO foram reunidas em dois frascos distintos, sendo um para a FNL-N e outro para a FL-N. Estas amostras foram concentradas em Amicon utilizando membrana YM-10 para um volume final de 5 mL. A FL-N foi dialisada no mesmo sistema utilizando tampão PBS em 10 vezes o volume inicial e posteriormente concentrada para um volume final de aproximadamente 1,5 mL.

A dosagem protéica das amostras concentradas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

3.8 – Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas

3.8.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada para avaliar o perfil protéico dos extratos e das frações antigênicas obtidas. Os antígenos e os padrões de peso moleculares foram submetidos a SDS-PAGE 12%, sob condições não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

Os géis foram preparados entre placas de vidro (10 x 10 cm) com 1,0 mm de espessura em suporte próprio do sistema Mini Cuba de Eletroforese Vertical (Omniphor MV10 Comp, USA). As amostras antigênicas foram preparadas em tampão de amostra 10X concentrado. Em pentes com molde para 10 poços as amostras foram utilizadas em uma concentração final de 20 µg (coloração do gel pela prata) e em pentes com molde para poço único as amostras foram utilizadas em uma concentração final de 200 µg (*immunoblotting*).

As amostras somente foram aplicadas nos géis após serem submetidas a 98°C em banho-maria durante 3 minutos.

A migração das proteínas foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 150 V por aproximadamente três horas. As proteínas em estudo foram visualizadas por coloração em nitrato de prata e comparadas aos padrões de peso moleculares (Sigma) das proteínas: β -galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), frutose-6-fosfato kinase de músculo de coelho (84 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa) anidrase carbônica de eritrócitos de bovino (29 kDa) e α -lactalbumina bovina (14 kDa).

3.8.2 – Coloração do gel por nitrato de prata

A coloração do gel por nitrato de prata (AgNO_3) foi realizada de acordo com Friedman (1982), na qual os polipeptídeos se destacam em tons amarelo-ferrugem. Após migração das proteínas o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora [metanol a 50% (Merck), ácido acético a 12% (Merck), formaldeído a 0,05% (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil)] por uma hora, em seguida o gel foi submetido a três banhos, em etanol (Merck) a 50%, de 10 minutos cada e um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 0,02% (Merck) por um minuto. O gel foi lavado três vezes por 20 segundos cada em água destilada e impregnado com solução de formaldeído a 0,04% adicionada de nitrato de prata (AgNO_3) a 2%, em câmara escura por 20 minutos. O gel foi lavado três vezes em água destilada por 20 segundos cada e revelado em solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) contendo 0,05% de formaldeído e 2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,02% até o aparecimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50% e ácido acético puro a 10%. O gel foi acondicionado entre folhas de celofane para secar.

3.9 – Testes Imunológicos

3.9.1 - ELISA - Determinação da titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase

Os extratos antigênicos foram analisados por ELISA na concentração de 10µg/mL de proteína total, as amostras de soro foram utilizadas na diluição de 1:200 e as amostras de LCR foram utilizadas puras, determinada por titulação em bloco. Foram utilizadas amostras de LCR controle positivo e soros controles positivo e negativo para IgG anti-metacestódeo de *T. solium* diluídas em PBS pH 7,2 adicionada de Tween 20 a 0,05% (PBS-T), e controles contendo PBS-T frente aos antígenos e PBS-T na ausência de antígenos. O conjugado anti-IgG-humana marcado com peroxidase (fração Fc específica, Sigma), foi preparado em PBS-T nas seguintes diluições, para soro e LCR, 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000 para obtenção do título ótimo.

3.9.2 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no soro e líquido cefalorraquidiano

As amostras foram testadas por teste ELISA para detecção de anticorpos IgG circulantes, de acordo com Costa (1986) com algumas modificações. Placas de microtitulação de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil) foram sensibilizadas com 50 µL de extrato salino e frações em concentração ideal de 10 µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas três vezes, de cinco minutos cada, com PBS acrescido de Tween 20 (PBS-T) a 0,05% (PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20). Após as lavagens as amostras de soros controles positivo, negativo e testes, na diluição de 1:200 em PBS-T, e as amostras de LCR puras, foram adicionadas (50 µL/poço) e incubadas por 45 minutos a 37 °C. Após novas lavagens com PBS-T, em três ciclos de cinco minutos, adicionou-se o conjugado IgG de cabra anti-IgG

humana-peroxidase (Sigma) na diluição de 1:2000 (50 µL/poço) e a reação foi incubada por 45 minutos a 37 °C. Após novos processos de lavagem, a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do substrato H₂O₂ diluído em solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD), preparado no momento de uso (0,005g de OPD + 12,5mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5µL de H₂O₂ 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida, com a adição de 25µL de solução 2 N de H₂SO₄. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor de placas (Titertek Multiskam Plus, Flow Laboratories McLean, USA).

O limiar de reatividade da reação (*cut off*) foi determinado pela média aritmética das DO, dos três soros controles negativos, acrescidos de 2 desvios padrões, conforme BASSI et al., 1991. O índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo a DO obtida pelas amostras pelo cut-off para cada antígeno (PARDINI et al., 2002). Os dados foram submetidos à análise por 'two-graph receiver operating characteristic' (TG-ROC), que avalia concomitantemente os valores de sensibilidade e de especificidade para obtenção com precisão do ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato analisado (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995). Foram calculadas as médias geométricas (mg) dos IR para cada grupo em cada extrato antigênico.

3.9.3 - Immunoblotting - Determinação da diluição das amostras biológicas e da titulação ideal para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*

O conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase *whole molecule* (Sigma) foi preparado em PBS-TM nas seguintes diluições, para LCR e soro 1:500; 1:1000; 1:1500 e 1:2000 para obtenção do título ótimo e cada amostra de soro controle (2 positivas e 3 negativas) foi testada nas seguintes diluições 1:50; 1:100 e 1:200. As amostras controles de LCR (2 positivas e 3 negativas) foram testadas puras, diluídas 1:5 e 1:10. Cada diluição foi submetida a todas as quatro diluições do conjugado.

3.9.4 - Immunoblotting para detecção de anticorpos IgG anti metacestódeos de *T. solium*

Após SDS-PAGE, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45µm) segundo Towbin; Staehelin; Gordon (1979) com algumas modificações. Foi preparado um “sandwich” com seis folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo frações antigênicas e mais seis folhas de papel de filtro, todos umedecidos em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol a 20%) e colocados em uma cuba de transferência para aplicação de uma corrente elétrica de 0,8mA por cm² durante duas horas. A membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para verificar a eficácia da transferência.

A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras verticais de 3mm e seus sítios ativos bloqueados com 1mL de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (1mL/tira) durante duas horas a temperatura ambiente sob agitação lenta. Após o bloqueio, a solução bloqueadora foi desprezada e adicionou-se às tiras 500µL das amostras de soro diluídas 1:100, e de LCR diluídas 1:5, em PBS-T acrescido de 1% de leite desnatado (PBS-TM). As tiras foram incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação lenta. Posteriormente, as tiras foram

submetidas a seis ciclos de lavagens, durante cinco minutos cada, com PBS-TM. Após as lavagens foram adicionados 500µL do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma) em PBS-TM na titulação ideal 1.500 para a reação com soro e líquido. As tiras foram incubadas por duas horas sob agitação lenta em temperatura ambiente. Foram submetidas a um ciclo de seis lavagens, de cinco minutos cada, com PBS. A revelação da reatividade foi efetuada pela adição de 500µL de 10 mL de PBS + 10mg de 3,3 de diaminobenzidina (DAB) + 500µL de H₂O₂. A reação foi interrompida após 3 minutos por lavagens sucessivas com água destilada, as reações positivas foram determinadas pela visualização de bandas marrons definidas correspondentes às frações antigênicas. A massa molecular relativa de cada banda reconhecida foi determinada por comparação com marcadores moleculares padrões, em kilo Dalton (kDa).

3.10 – Normas de Biossegurança

O procedimento de colheita e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.11 – Análise dos dados

A sensibilidade, especificidade e a eficiência do diagnóstico (ED) foram calculados de acordo com Barbieri et al. (1998). O “Youden index” (YI) foi determinado de acordo com Younden (1950), utilizando-se das seguintes definições: verdadeiro positivo (Vp), verdadeiro negativo (Vn), falso positivo (Fp) e falso negativo (Fn).

$$\text{Sensibilidade \%} = \text{Vp} / (\text{Vp} + \text{Fn}) \times 100$$

$$\text{Especificidade \%} = \text{Vn} / (\text{Vn} + \text{Fp}) \times 100$$

$$\text{ED \%} = (\text{Vp} + \text{Vn}) / (\text{Vp} + \text{Fp} + \text{Vn} + \text{Fn}) \times 100$$

$$\text{YI \%} = (\text{Vp} \times \text{Vn}) - (\text{Fn} \times \text{Fp}) / (\text{Vp} + \text{Fn}) \times (\text{Fp} + \text{Vn})$$

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

A análise comparativa entre os extratos e entre os grupos no ELISA e entre as frequências de reconhecimento de peptídeos antigênicos no *immunoblotting* foi realizada através do programa de BioEstatic 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% ($p < 0,05$).

O peso molecular dos peptídeos foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores versus a motilidade relativa (Rf), obtida através da fórmula:

$$Rf = \text{Distância da origem à migração} / \text{Distância da origem ao ponto de referência.}$$

4 – RESULTADOS

4.1 – Fracionamento do extrato salino de metacestódeo de *T. saginata* por cromatografia de afinidade

A concentração protéica obtida para os dez diferentes antígenos foi: extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso) – 3000 µg/mL; extrato salino total de metacestódeo de *T. saginata* (S MTsa) – 2900 µg/mL; fração não-ligante de jacalina (FNL-J) – 1800 µg/mL; fração ligante de jacalina (FL-J) - 620 µg/mL; fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) – 500 µg/mL; fração ligante de concanavalina A (FL-ConA) – 100 µg/mL; fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ) – 660 µg/mL; fração ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FL-ConAJ) – 100 µg/mL; fração não ligante de N-acetil (FNL-N) – 150 µg/mL e fração ligante de N-acetil (FL-N) – 100 µg/mL.

A absorbância das frações coletadas com os diferentes picos obtidos em cada tubo está expressa em curvas nas Figuras de 1 a 4, representando, respectivamente, cromatografia de afinidade em coluna de jacalina, coluna de concanavalina A (coluna de concanavalina A utilizando a fração não-ligante de jacalina) e coluna de N-acetilglicosamina.

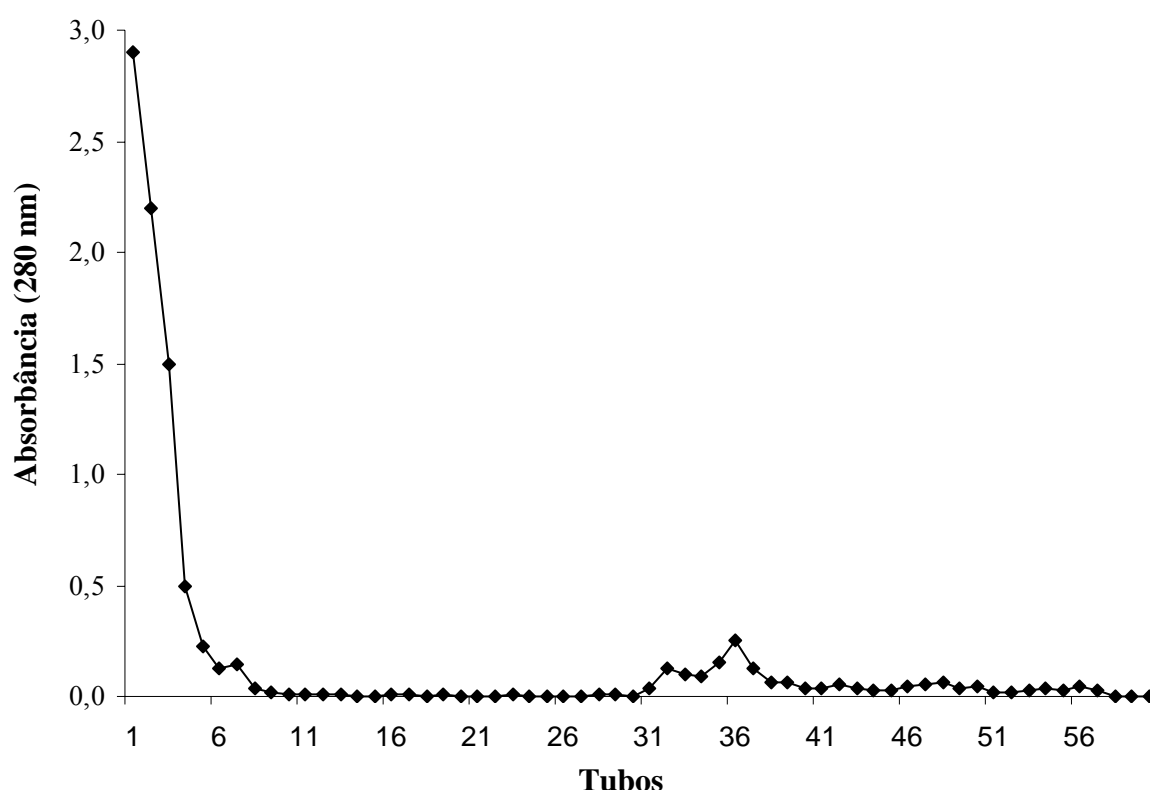


Figura 1. Cromatografia de afinidade em coluna de **Agarose-Jacalina** utilizando o extrato salino total de formas metacestódeas de *T. saginata*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos de 1 a 30 representam as frações não ligantes (FNL-J) eluídas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e os de 31 a 60 representam as frações ligantes (FL-J) eluídas com D-+-Galactose (0,4M) em PBS.

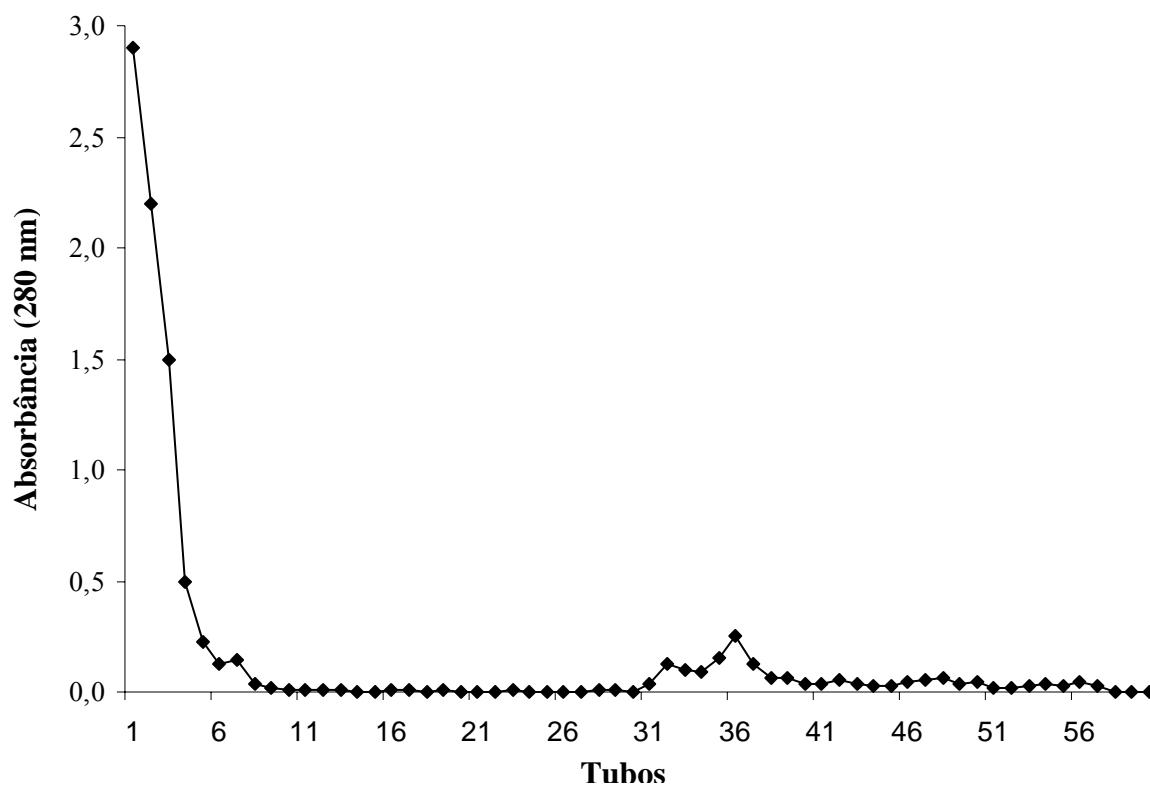


Figura 2. Cromatografia de afinidade em coluna de **Agarose-Concanavalina (ConA)** utilizando extrato salino total de formas metacestódeas de *T. saginata*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos numerados de 1 a 30 representam as FNL de ConA (FNL-ConA) eluídas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e de 31 a 60 as frações ligantes eluídas com Methyl- α -D-Manopiranosídeo (0,2M) em PBS.

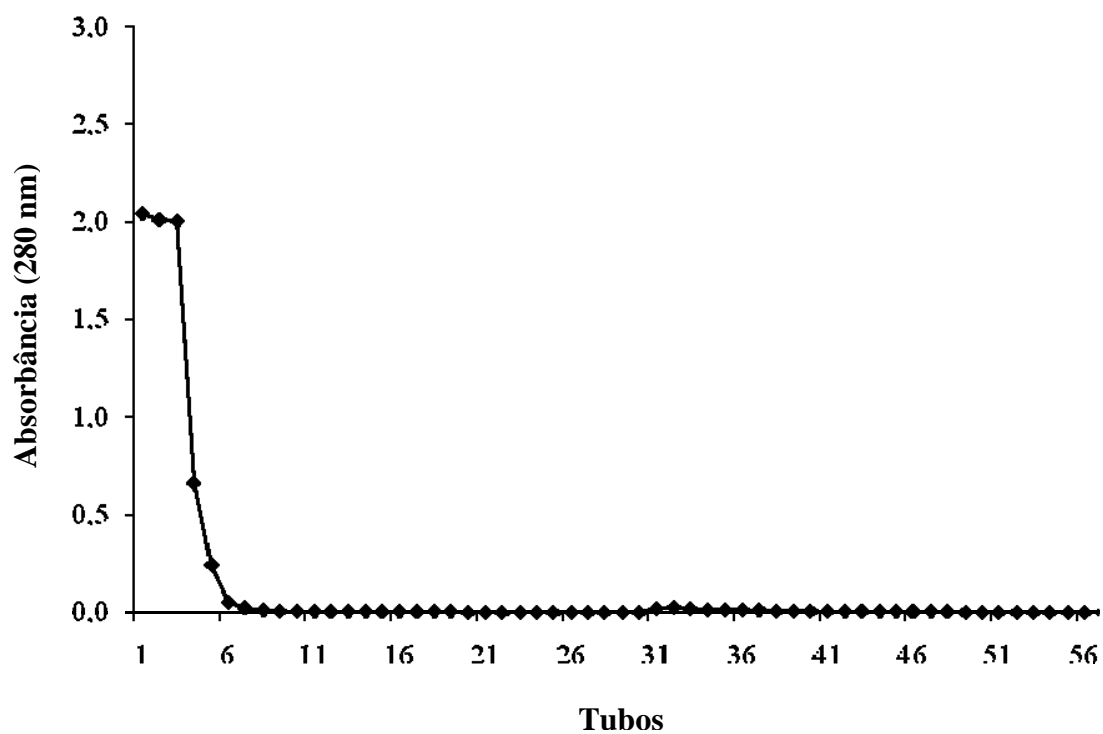


Figura 3. Cromatografia de afinidade em coluna de **Agarose-Concanavalina (ConA) utilizando a fração não ligante (FNL-J) de jacalina** do extrato salino total de formas metacestódeas de *T. saginata*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos numerados de 1 a 30 representam as FNL de ConA (FNL-ConAJ) eluídas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e de 31 a 60 as frações ligantes eluídas com Metil- α -D-Manopiranosídeo (0,2M) em PBS.

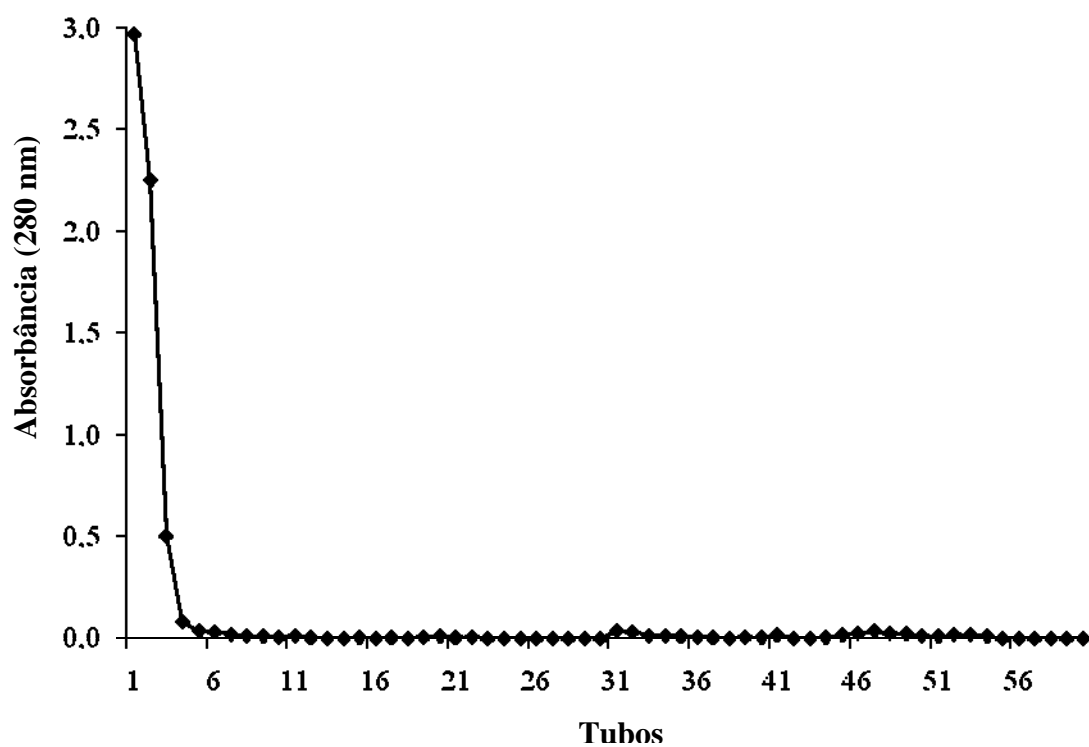


Figura 4. Cromatografia de afinidade em coluna **Agarose-N-acetil-glicosamina** utilizando o extrato salino de formas metacestódeas de *T. saginata*. As leituras das frações colhidas são dadas em absorvância por cada tubo isoladamente. Os tubos numerados de 1 a 30 representam as frações não ligantes (FNL-N) eluídas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e de 31 a 60 as frações ligantes (FL-N) eluídas D-+-Glucose (0,4M) em PBS.

A Figura 5 permite visualizar o perfil eletroforético do SMTsa e suas frações obtidas por cromatografias de afinidade. No SMTsa foram visualizadas bandas de 116, 110, 75, 70, 64-68, 47-52, 39-42, 24, 18 e 12-14 kDa. As bandas visualizadas na FNL-J foram 70, 47-52, 18 e 12-14 kDa, enquanto em FL-J foi visualizada apenas a banda de 64-68 kDa. Na FNL-ConA foi observada as bandas de 64-68, 47-52 e 24 kDa e em sua fração ligante (FL-ConA) foi visualizada a banda de 64-68 kDa. Utilizando FNL-ConAJ foram visualizadas as bandas de 64-68, 60, 47-52 e 24 kDa, em FL-ConAJ foi observada a banda de 64-68 kDa. A fração não-ligante da cromatografia de afinidade em coluna de N-acetil (FNL-N) demonstrou a banda de 64-68 kDa, no entanto não foi possível visualizar nenhuma banda em sua fração ligante (FL-N).

Com o objetivo de avaliar as diferentes frações obtidas foi realizado um teste preliminar pelos métodos ELISA (Figuras 6 e 7) e *Immunoblotting* (Figura 8) em amostras de soro representativas dos três grupos de estudo e, particularmente, com indivíduos infectados por *E. granulosus* devido à alta reatividade cruzada com NC.

O teste ELISA utilizando a FL-J demonstrou alta sensibilidade, porém baixa especificidade (Figura 6). Esta sensibilidade não foi observada na reação de *Immunoblotting*, uma vez que não houve o reconhecimento de nenhuma banda imunogênica por pacientes do Grupo 1 (Figura 8).

As FL-ConA (Figura 6) e FL-ConAJ (Figura 7) demonstraram baixa sensibilidade no teste ELISA e baixa sensibilidade e especificidade na reação de *Immunoblotting*, não sendo possível distinguir bandas imunogênicas específicas de pacientes do Grupo 1 (Figura 8).

A cromatografia de afinidade em coluna N-acetilglicosamina, além de baixo rendimento protéico, apresentou baixa densidade óptica, pelo teste ELISA, em suas frações ligante e não-ligante, interferindo em sua sensibilidade (Figura 7). Na reação de

Immunoblotting não foi reconhecida nenhuma banda imunogênica em nenhum dos soros testados utilizando as duas frações da cromatografia em N-acetil (Figura 8).

As frações não-ligantes das colunas de jacalina, concanavalina A e concanavalina A utilizando a fração não-ligante de jacalina demonstraram maior sensibilidade e especificidade em relação às suas respectivas frações ligantes. Sendo assim, as demais amostras foram testadas, por ELISA e *Immunoblotting*, com SMTsa e suas frações FNL-J, FNL-ConA e FNL-ConAJ.

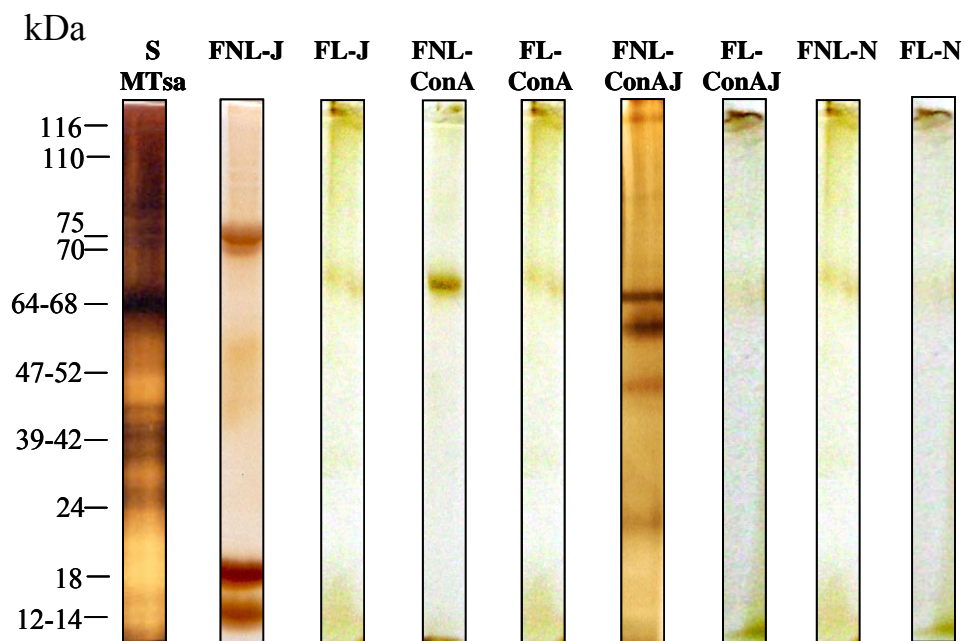


Figura 5. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% (corado por nitrato de prata) do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e suas respectivas frações purificados por cromatografias de afinidade. Extrato salino total (S MTsa); fração não-ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de jacalina (FNL-J); fração ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de jacalina (FL-J); fração não-ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de ConA (FNL-ConA); fração ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de ConA (FL-ConA); fração não-ligante de ConA da fração não-ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de jacalina (FNL-ConAJ); fração ligante de ConA da fração não-ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de jacalina (FL-ConAJ); fração não-ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de N-acetil (FNL-N); fração ligante do extrato S MTsa obtido em coluna de N-acetil (FL-N).

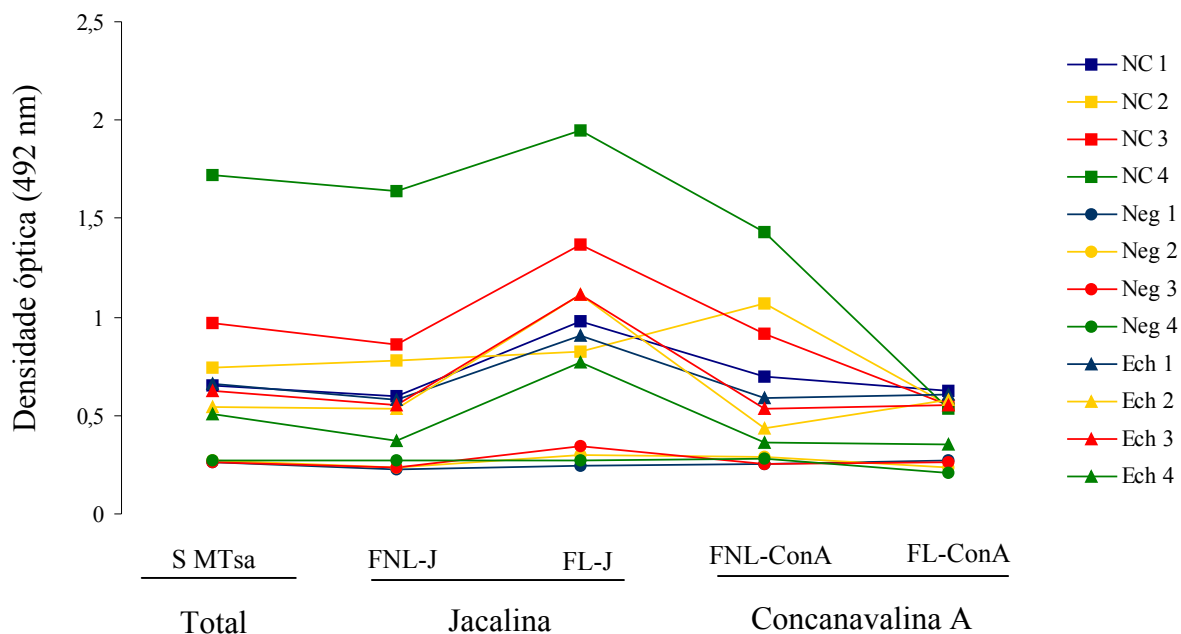


Figura 6. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* por ELISA frente aos diferentes extratos obtidos a partir do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina e Concanavalina A. Amostras de soro representativas na diluição de 1:200. NC = pacientes com neurocisticercose, Neg = indivíduos negativos, Ech = indivíduos infectados por *Echinococcus granulosus*, FNL-J = fração não ligante de jacalina, FL-J = fração ligante de jacalina, FNL-ConA = fração não-ligante da coluna de Concanavalina A, FL-ConA = fração ligante da coluna de Concanavalina A.

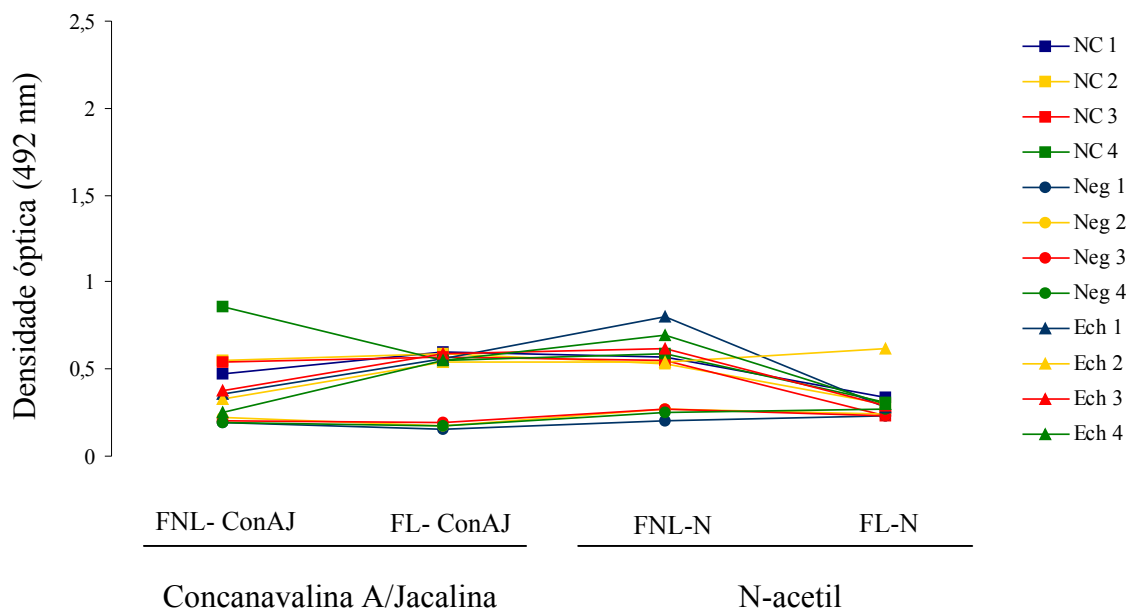


Figura 7. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* por ELISA frente aos diferentes extratos obtidos a partir do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A e N-acetil. Amostras de soro representativas na diluição de 1:200. NC = pacientes com neurocisticercose, Neg = indivíduos negativos, Ech = indivíduos infectados por *Echinococcus granulosus*, FNL-ConAJ = fração não ligante da coluna de Concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina, FL-ConAJ = fração ligante de Concanavalina A obtida a partir da fração não ligante de jacalina. FNL-N = fração não ligante de N-acetil-glicosamina, FL-N = fração ligante de N-acetilglicosamina.

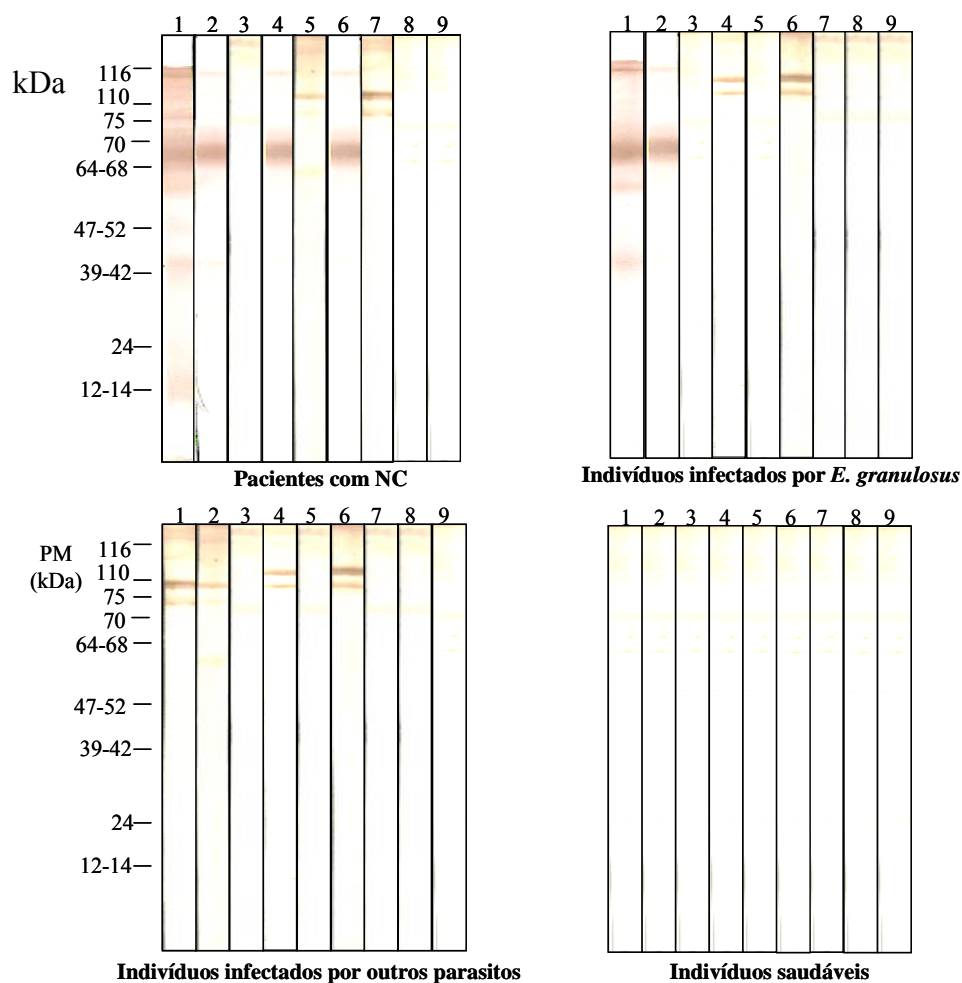


Figura 8. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente aos eluatos obtidos a partir de cromatografias de afinidade utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa). Linhas 1: S MTsa; Linhas 2: Fração não ligante de Jacalina (FNL-J); Linhas 3: Fração ligante de Jacalina (FL-J); Linhas 4: Fração não ligante de ConA (FNL-ConA); Linhas 5: Fração ligante de ConA (FL-ConA); Linhas 6: Fração não ligante de ConA utilizando a fração não ligante de cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina (FNL-ConAJ); Linhas 7: Fração ligante de ConA utilizando a fração não ligante de Jacalina (FL-ConAJ); Linhas 8: Fração não ligante de N-acetilglicosamina (FNL-N); Linhas 9: Fração ligante de N-acetilglicosamina (FL-N). No grupo de indivíduos infectados por outros parasitos foi utilizada amostra de soro referente à infecção por *Taenia* sp.

4.2 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* utilizando S MTsa e suas frações obtidas por cromatografias de afinidade

A análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao S MTsa e à fração FNL-J em amostras de soro dos Grupos 1, 2 e 3 está demonstrada na Figura 9. Na Figura 10 é possível observar a análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente à fração FNL-ConA e à FNL-ConAJ em amostras de soro dos Grupos 1, 2 e 3. De acordo com os critérios da curva de TG-ROC ficou definido para S MTsa, FNL-J e FNL-ConA que todas as amostras com $IR > 1,1$ foram positivas. Para FNL-ConAJ as amostras foram positivas com $IR > 1,3$.

A Figura 11 apresenta os níveis de IgG séricas anti-metacestódeos de *T. solium* e as porcentagens de positividade obtidos por ELISA frente ao S MTsa e às frações FNL-J e FNL-ConA. Os valores obtidos utilizando a fração FNL-ConAJ estão expressos na Figura 12. As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados do teste ELISA utilizando S MTsa e sua frações (FNL-J, FNL-ConA e FNL-ConAJ) frente às amostras de soro de 40 pacientes com NC (Grupo 1), 62 indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (Grupo 2) e 40 indivíduos saudáveis (Grupo 3), respectivamente.

A reatividade cruzada foi mais freqüente em amostras de soro de indivíduos infectados por *E. granulosus*, *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* utilizando S MTsa e FNL-J. Esta reatividade foi menor quando as frações FNL-ConA e FNL-ConAJ foram utilizadas (Tabela 4).

Os dados referentes à sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico e Índice Youden, obtidos por ELISA para as diferentes amostras antigênicas, estão demonstrados na Tabela 5. Os valores de p , comparando cada amostra antigênica, em cada grupo estão apresentados na Tabela 6. Os dados obtidos indicam a fração FNL-ConA, como antígeno mais sensível e específico, dentre os analisados para o diagnóstico sorológico da NC humana.

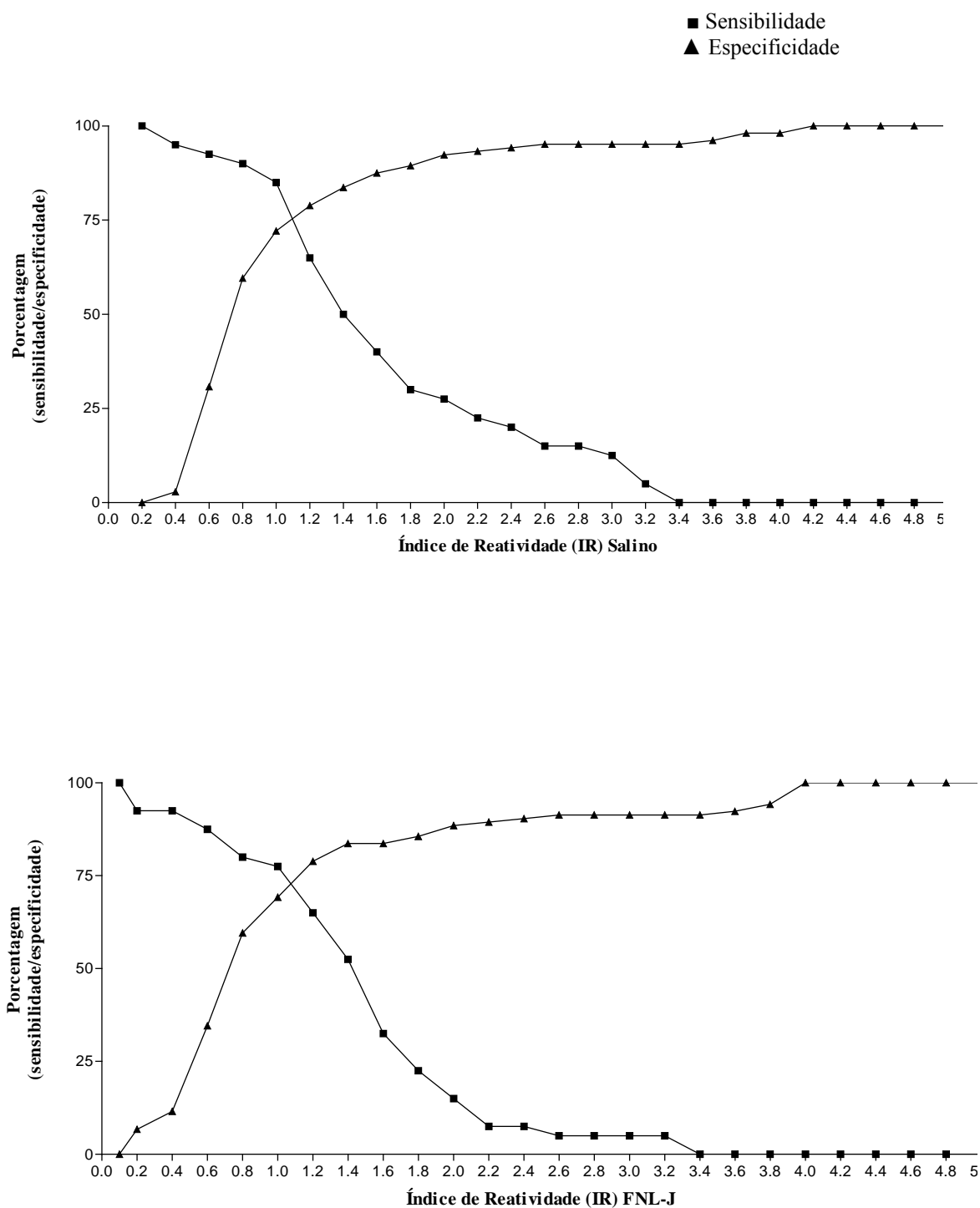


Figura 9. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao extrato salino total (S MTsa) e à fração não ligante de jacalina (FNL-J) obtida em cromatografia de afinidade de extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com NC, n=40) foram utilizadas para o cálculo de sensibilidade e dos indivíduos do grupo 2 (indivíduos com *Taenia* sp. e outros parasitos, n=62) e grupo 3 (indivíduos saudáveis, n=30) para o cálculo de especificidade.

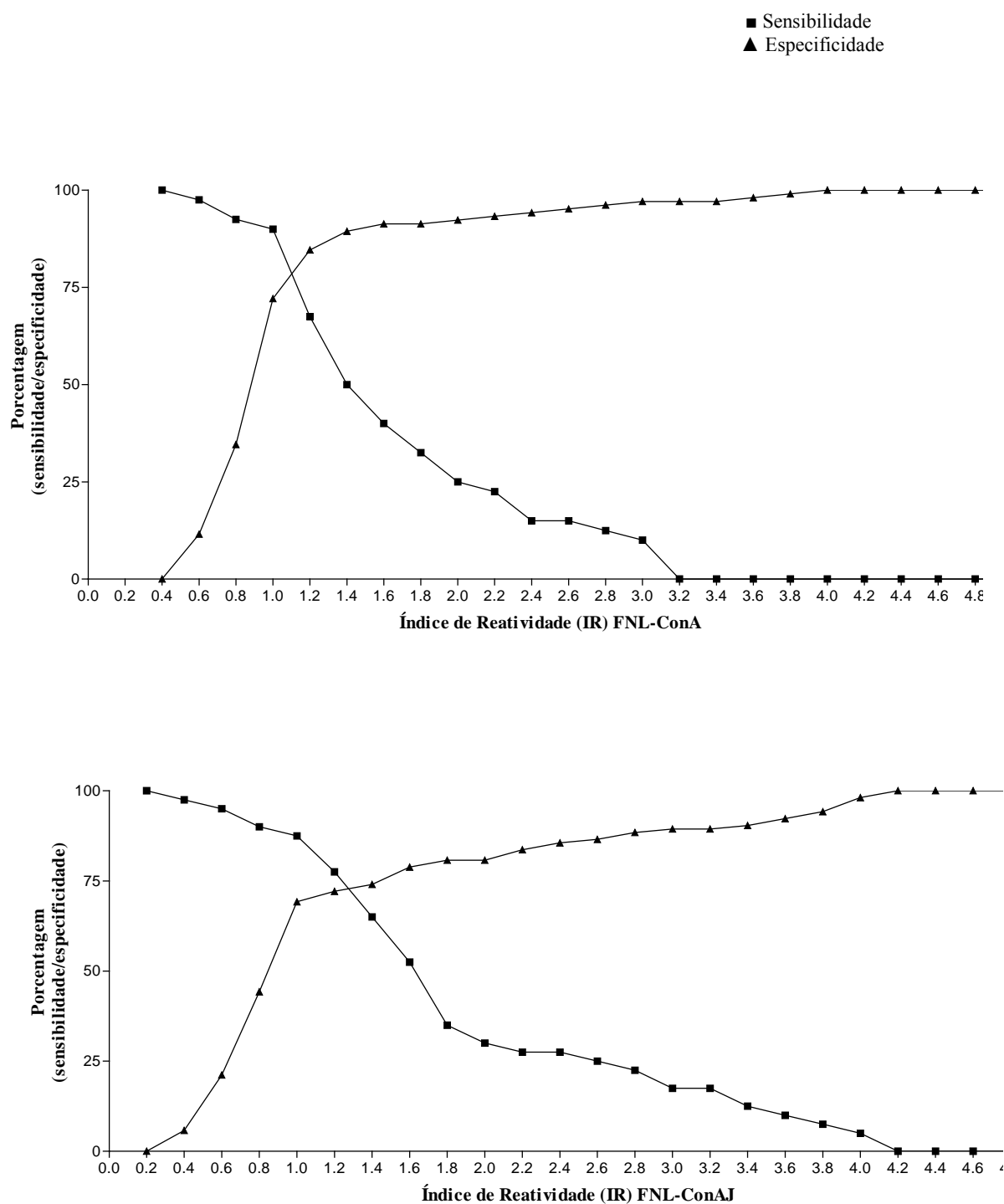


Figura 10. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-metacésteos de *T. solium* frente à fração não ligante de concanavalina A (FNL-ConA) obtida em cromatografia do extrato salino total de metacésteos de *T. saginata* e à fração não ligante de concanavalina A utilizando a fração não ligante de Jacalina do extrato salino total de metacésteos de *T. saginata* (FNL-ConAJ). Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos do grupo 1 (pacientes com NC, n=40) foram utilizadas para o cálculo de sensibilidade e dos indivíduos do grupo 2 (indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. n=62) e grupo 3 (indivíduos saudáveis, n=30) para o cálculo de especificidade.

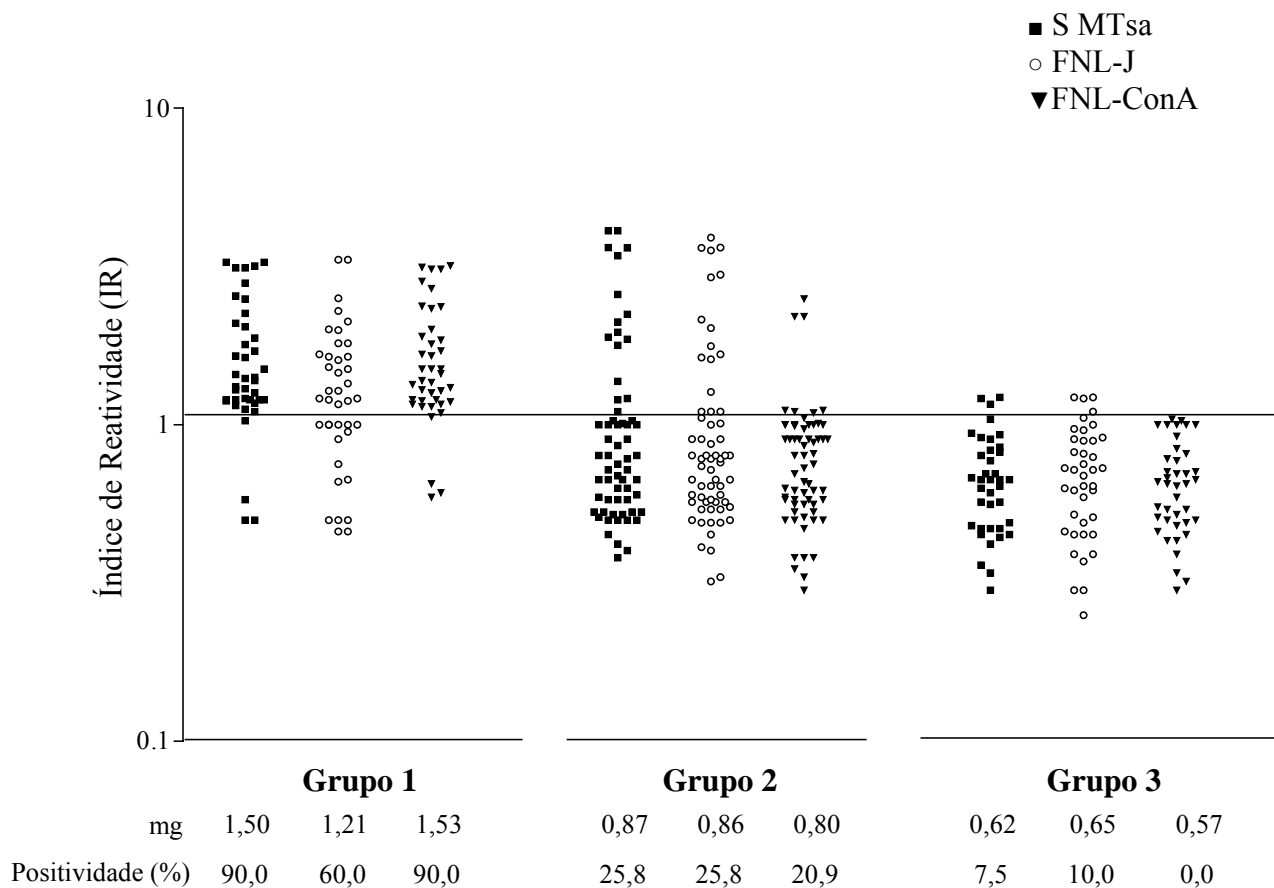


Figura 11. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente ao extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e às frações não-ligante de jacalina (FNL-J) e de concanavalina A (FNL-ConA) do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*. Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (n=62) e 3- indivíduos saudáveis (n=30) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1,1 (*cut off*); mg: média geométrica.

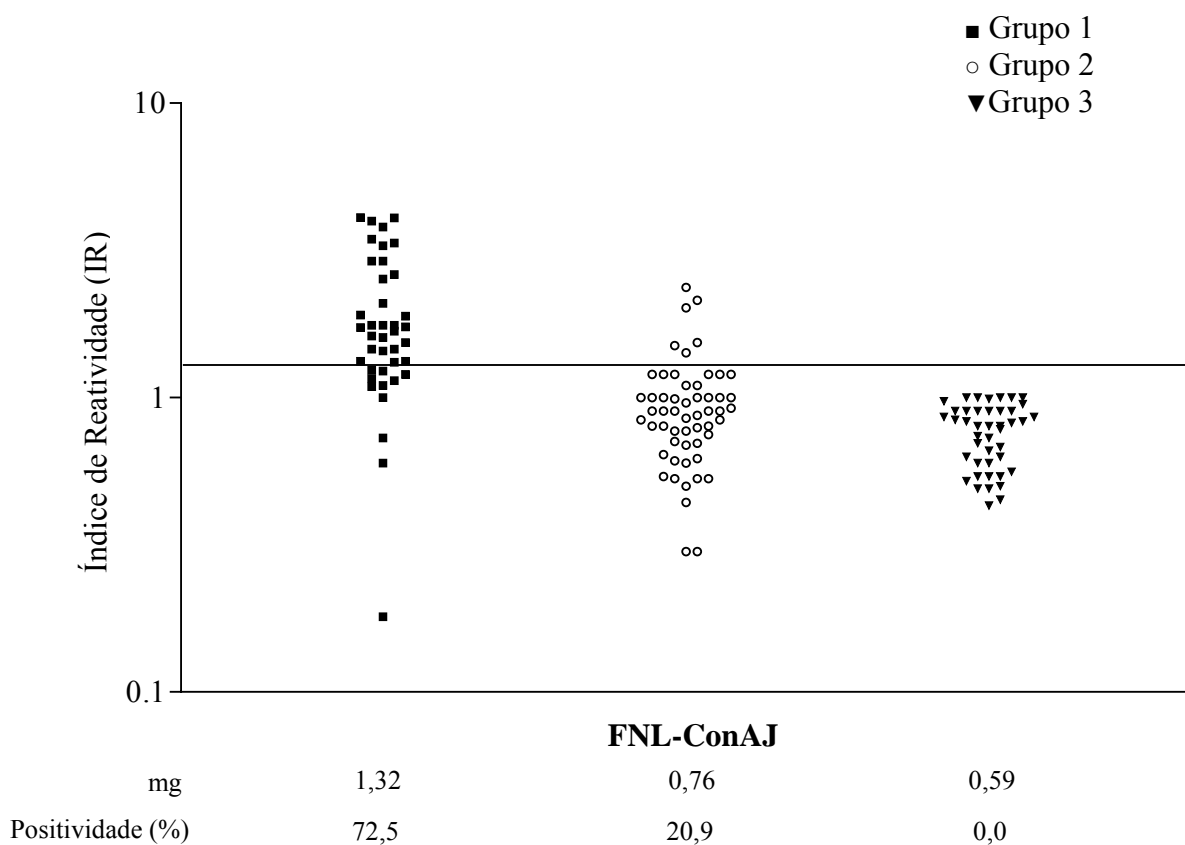


Figura 12. Níveis de IgG sérica anti-metacestódeos de *T. solium* obtidos por ELISA frente à fração não-ligante concanavalina A obtido pela fração não-ligante de jacalina do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (FNL-ConAJ). Amostras de soro na diluição 1:200 dos indivíduos dos grupos: 1- neurocisticercose (n=40); 2- indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (n=62) e 3- indivíduos saudáveis (n=30) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1,3 (*cut off*); mg: média geométrica.

Tabela 1. Resultados dos testes ELISA de 40 pacientes com neurocisticercose (Grupo 1), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa), fração não-ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA			
			S MTsa	FNL-J	FNL-ConA	FNL-ConAJ
1	F	28	+	+	+	+
2	F	37	+	-	-	+
3	F	14	+	-	+	+
4	M	51	+	+	+	+
5	M	53	+	+	+	+
6	M	41	+	+	+	+
7	M	36	-	-	-	-
8	M	30	-	-	-	-
9	F	19	+	+	+	+
10	M	29	+	+	+	+
11	F	41	+	-	+	+
12	M	61	+	-	+	+
13	M	18	+	+	+	+
14	M	35	+	-	+	+
15	F	44	+	+	+	+
16	M	26	-	-	-	-
17	M	29	+	+	+	+
18	F	57	+	+	+	+
19	F	33	+	+	+	+
20	M	60	+	-	+	-
21	M	60	+	-	+	-
22	M	46	-	+	+	+
23	M	10	+	+	+	+
24	M	10	+	+	+	+
25	F	50	+	-	+	-
26	F	46	+	+	+	+
27	F	16	+	+	+	+
28	F	41	+	+	+	+
29	F	49	+	-	+	-
30	F	28	+	+	+	+
31	M	43	+	+	+	+
32	M	38	+	+	+	+
33	M	32	+	-	+	-
34	M	27	+	-	+	-
35	F	35	+	-	+	-
36	F	53	+	+	+	+
37	F	28	+	-	+	-
38	M	30	+	+	+	+
39	M	44	+	+	+	+
40	F	43	+	+	+	+

F= Feminino; M= Masculino; + = Positivo; - = Negativo

Tabela 2. Resultados dos testes ELISA de 62 indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (Grupo 2), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa), fração não-ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Parasito	ELISA			
				S MTsa	FNL-J	FNL-ConA	FNL-ConAJ
1	F	14	Ancilostomídeo	—	—	—	—
2	F	12	Ancilostomídeo	—	—	—	—
3	F	9	Ancilostomídeo	—	—	—	—
4	M	11	Ancilostomídeo	—	—	—	—
5	M	8	Ancilostomídeo	—	—	—	—
6	F	23	Ancilostomídeo	—	—	—	—
7	F	9	<i>A. lumbricoides</i>	—	—	—	—
8	M	12	<i>A. lumbricoides</i>	—	—	—	—
9	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	—	—	—	—
10	F	8	<i>A. lumbricoides</i>	—	—	—	—
11	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	—	—
12	M	8	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	—	—
13	F	10	<i>E. vermicularis</i>	—	—	—	—
14	F	14	<i>E. vermicularis</i>	—	—	—	—
15	M	10	<i>E. vermicularis</i>	—	—	—	—
16	M	7	<i>E. vermicularis</i>	—	—	—	—
17	F	23	<i>E. vermicularis</i>	—	+	—	—
18	M	10	<i>E. vermicularis</i>	+	—	—	—
19	M	9	<i>G. lamblia</i>	—	—	—	—
20	M	7	<i>G. lamblia</i>	—	—	—	—
21	M	10	<i>G. lamblia</i>	—	—	—	—
22	F	10	<i>G. lamblia</i>	—	—	—	—
23	M	61	<i>S. stercoralis</i>	+	+	+	—
24	F	54	<i>S. stercoralis</i>	+	+	—	—
25	M	39	<i>S. stercoralis</i>	—	—	—	—
26	M	39	<i>S. stercoralis</i>	—	—	—	—
27	M	40	<i>H. nana</i>	+	+	—	—
28	F	41	<i>H. nana</i>	—	+	—	—
29	M	45	<i>H. nana</i>	—	—	—	—
30	F	22	<i>H. nana</i>	—	—	—	—
31	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	—	—	—
32	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
33	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
34	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
35	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	—	—
36	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	—	—
37	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
38	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
39	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	+	+
40	ND	ND	<i>E. granulosus</i>	+	+	—	—

Cont.

				S	FNL-J	FNL-ConA	FNL-ConAJ
41	F	31	<i>T. trichiura</i>	—	—	—	—
42	M	10	<i>T. trichiura</i>	—	—	—	—
43	F	24	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
44	M	29	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
45	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
46	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
47	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
48	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
49	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
50	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
51	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
52	ND	ND	<i>S. mansoni</i>	—	—	—	—
53	F	70	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
54	F	30	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
55	F	40	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
56	F	30	<i>T. solium</i>	—	—	—	—
57	F	37	<i>Taenia</i> sp	—	—	—	—
58	F	45	<i>Taenia</i> sp	—	—	—	—
59	F	51	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
60	F	42	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
61	F	46	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—
62	F	39	<i>T. saginata</i>	—	—	—	—

F= Feminino; M= Masculino; + = Positivo; - = Negativo; ND= não disponível

Tabela 3. Resultados dos testes ELISA de 40 indivíduos saudáveis (Grupo 3), para detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando extrato salino total de metacésteos de *T. saginata* (S MTsa), fração não-ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ).

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA			
			S MTsa	FNL-J	FNL-ConA	FNL-ConAJ
1	F	34	-	-	-	-
2	F	23	-	-	-	-
3	M	24	-	-	-	-
4	M	21	-	-	-	-
5	M	21	+	-	-	-
6	F	22	-	-	-	-
7	F	24	-	-	-	-
8	F	05	-	+	-	-
9	M	62	-	-	-	-
10	F	24	-	-	-	-
11	F	26	-	-	-	-
12	F	25	+	-	-	-
13	F	66	-	-	-	-
14	F	25	-	-	-	-
15	M	53	-	-	-	-
16	M	19	-	-	-	-
17	M	23	-	-	-	-
18	M	17	-	-	-	-
19	F	35	-	-	-	-
20	F	46	-	+	-	-
21	M	22	-	-	-	-
22	F	36	-	+	-	-
23	M	51	-	-	-	-
24	F	23	-	-	-	-
25	M	24	-	-	-	-
26	F	25	-	-	-	-
27	M	26	+	-	-	-
28	M	44	-	-	-	-
29	F	19	-	-	-	-
30	M	24	-	-	-	-
31	F	25	-	-	-	-
32	F	23	-	-	-	-
33	M	29	-	-	-	-
34	F	28	-	-	-	-
35	F	04	-	-	-	-
36	F	19	-	+	-	-
37	F	02	-	-	-	-
38	M	25	-	-	-	-
39	F	24	-	-	-	-
40	F	06	-	-	-	-

F= Feminino; M= Masculino; + = Positivo; - = Negativo

Tabela 4. Reatividade das amostras de soro de indivíduos do Grupo 2 (indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp.) e do Grupo 3 (indivíduos aparentemente saudáveis) utilizando extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa), fração não ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ) na detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* pelo teste ELISA.

	ELISA			
	n+ (%)			
	S MTsa	FNL-J	FNL-ConA	FNL-ConAJ
Grupo 2 (n=62)				
Ancilostomídeo (n=6)	0	0	0	0
<i>A. lumbricoides</i> (n=6)	2 (33,3)	2 (33,3)	0	0
<i>E. vermicularis</i> (n=6)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	0
<i>G. lamblia</i> (n=4)	0	0	0	0
<i>S. stercoralis</i> (n=4)	2 (50,0)	2 (50,0)	1 (16,7)	0
<i>H. nana</i> (n=4)	1 (25,0)	2 (50,0)	0	0
<i>E. granulosus</i> (n=10)	10 (100,0)	9 (90,0)	6 (60,0)	6 (60,0)
<i>T. trichiura</i> (n=2)	0	0	0	0
<i>S. mansoni</i> (n=10)	0	0	0	0
<i>Taenia</i> sp. (n=10)	0	0	0	0
Grupo 3 (n=40)				
Indivíduos saudáveis	3 (7,5)	4 (10,0)	0	0
Total	19	20	7	6

n+ = número de amostras positivas

Tabela 5. Sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e Índice de Youden obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro, utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa), fração não ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida a partir fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ).

Amostra antigênica	ELISA			
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED	Índice de Youden
S MTsa	90,0	81,4	83,8	0,71
FNL-J	60,0	80,4	74,6	0,40
FNL-ConA	90,0	93,1	92,3	0,83
FNL-ConAJ	72,5	94,1	88,0	0,67

Tabela 6. Comparação entre os diferentes extratos antigênicos para cada grupo estudado em relação aos valores de p obtidos a partir do número de sucessos em cada caso nos testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro dos Grupos: 1 = pacientes com NC; 2 = indivíduos infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. e 3 = indivíduos saudáveis.

Extratos antigênicos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
S MTsa e FNL-J	$p = 0,0010^*$	$p = 1$	$p = 0,3462$
S MTsa e FNL-ConA	$p = 1$	$p = 0,0188^*$	$p = 0,0829$
S MTsa e FNL-ConAJ	$p = 0,0225^*$	$p = 0,0094^*$	$p = 0,0829$
FNL-J e FNL-ConA	$p = 0,0010^*$	$p = 0,0188^*$	$p = 0,0448^*$
FNL-J e FNL-ConAJ	$p = 0,1186$	$p = 0,0094^*$	$p = 0,0448^*$
FNL-ConA e FNL-ConAJ	$p = 0,0225^*$	$p = 0,3847$	$p = 1$

Extratos antigênicos: extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa), fração não ligante de jacalina (FNL-J), fração não-ligante de concanavalina A (FNL-ConA) e fração não-ligante de concanavalina A obtida pela fração não ligante de jacalina (FNL-ConAJ).

* Diferença estatisticamente significativa determinada pelo teste da diferença entre duas proporções ($p < 0,05$).

4.3 – Immunoblotting para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* utilizando S MTsa e suas frações obtidas por cromatografia de afinidade

A Figura 13 demonstra o perfil de reconhecimento de bandas imunogênicas por amostras de soro representativas dos grupos 1, 2 e 3, utilizando S MTsa. O intenso reconhecimento de bandas pelos indivíduos infectados por *E. granulosus* pode ser observado.

O perfil de reconhecimento de bandas imunogênicas pelas amostras de soro testadas utilizando as frações FNL-J, FNL-ConA e FNL-ConAJ pode ser visualizado nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.

As porcentagens de amostras de soro dos grupos 1, 2 e 3 que apresentam reconhecimento das bandas imunogênicas no S MTsa e em suas frações não-ligantes (FNL-J, FNL-ConA e FNL-ConAJ) são demonstradas na Figura 17. A banda de 64-68 kDa apresentou 100% de especificidade quando as amostras foram testadas utilizando as frações FNL- ConA e FNL-ConAJ.

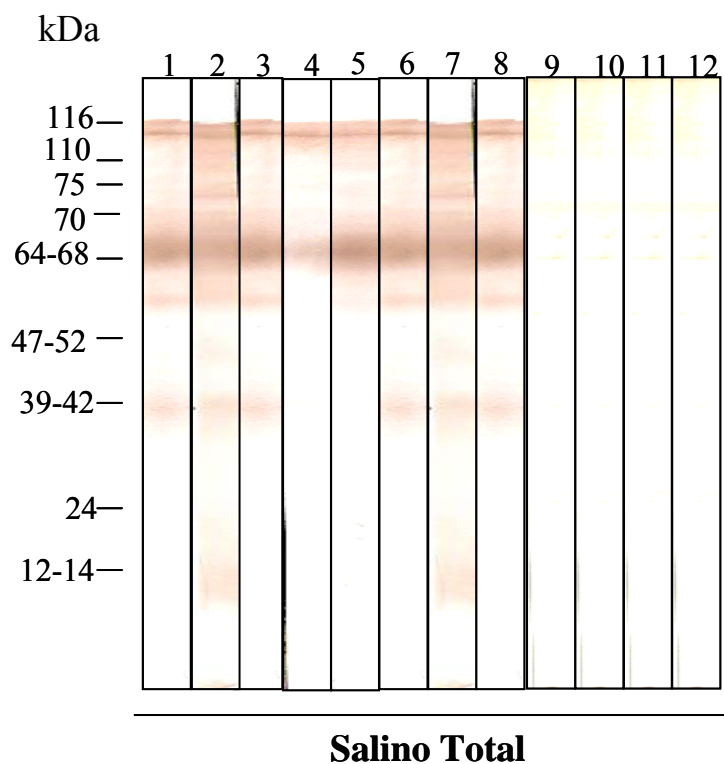


Figura 13. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente ao extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa). Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC. Linhas de 5 a 8: indivíduos infectados por *E. granulosus*. Linhas de 9 a 12: indivíduos saudáveis.

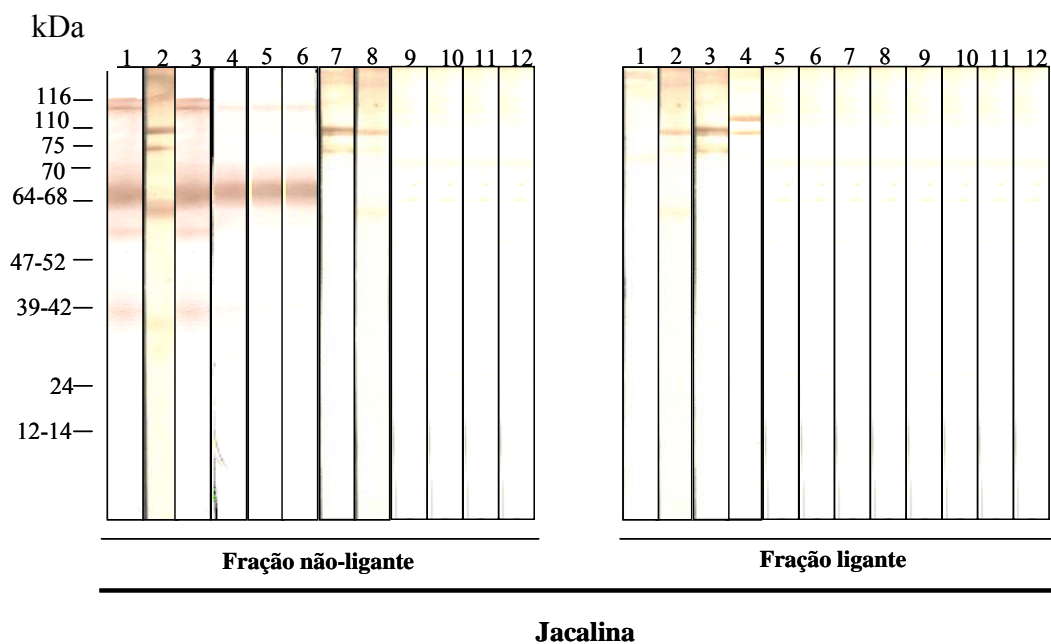


Figura 14. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente às frações obtidas a partir da cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC. Linhas de 5 a 8: indivíduos infectados por *E. granulosus*. Linhas de 9 a 12: indivíduos saudáveis.

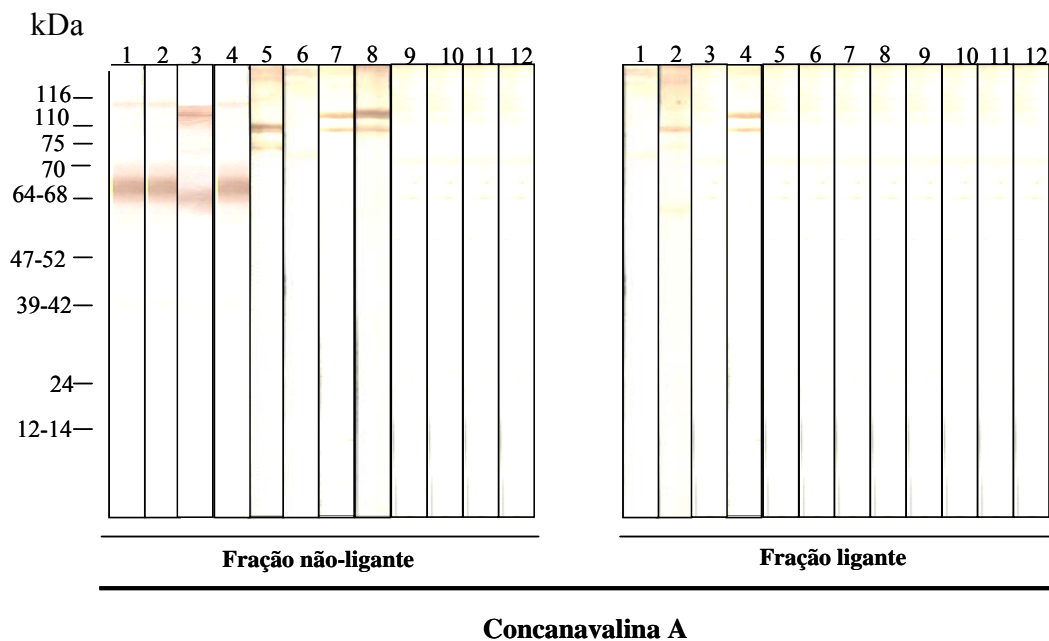


Figura 15. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente às frações obtidas a partir da cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A utilizando o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC. Linhas de 5 a 8: indivíduos infectados por *E. granulosus*. Linhas de 9 a 12: indivíduos saudáveis.

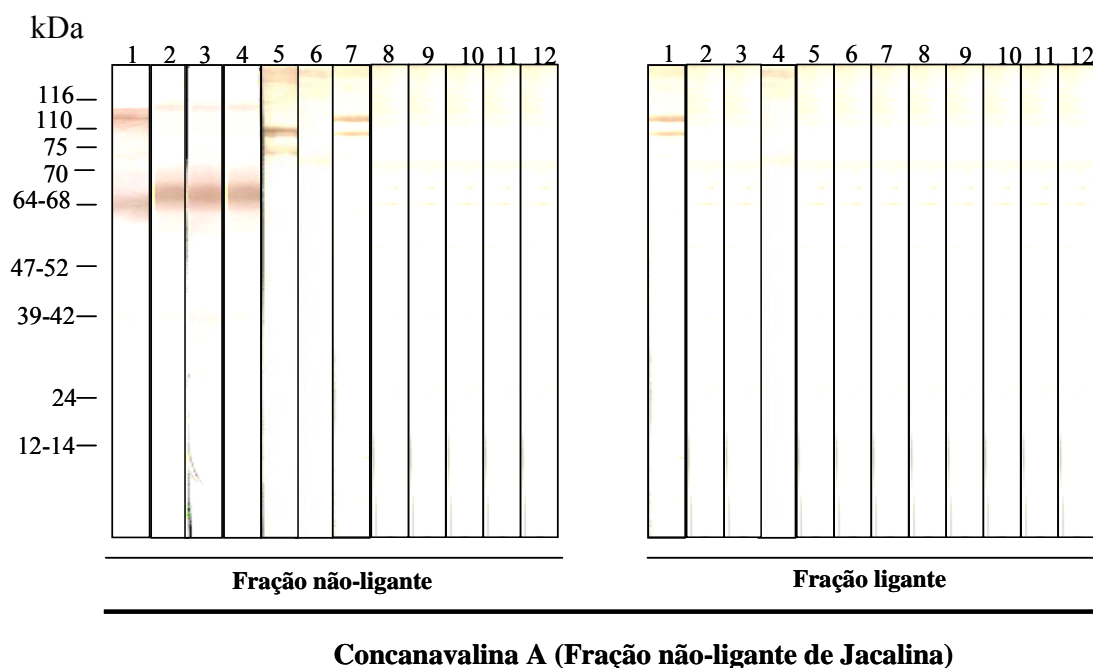


Figura 16. *Immunoblotting* utilizando amostras de soro representativas frente às frações obtidas a partir da cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A utilizando a fração não ligante da cromatografia de afinidade em coluna de Jacalina do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*. Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC. Linhas de 5 a 8: indivíduos infectados por *E. granulosus*. Linhas de 9 a 12: indivíduos saudáveis.

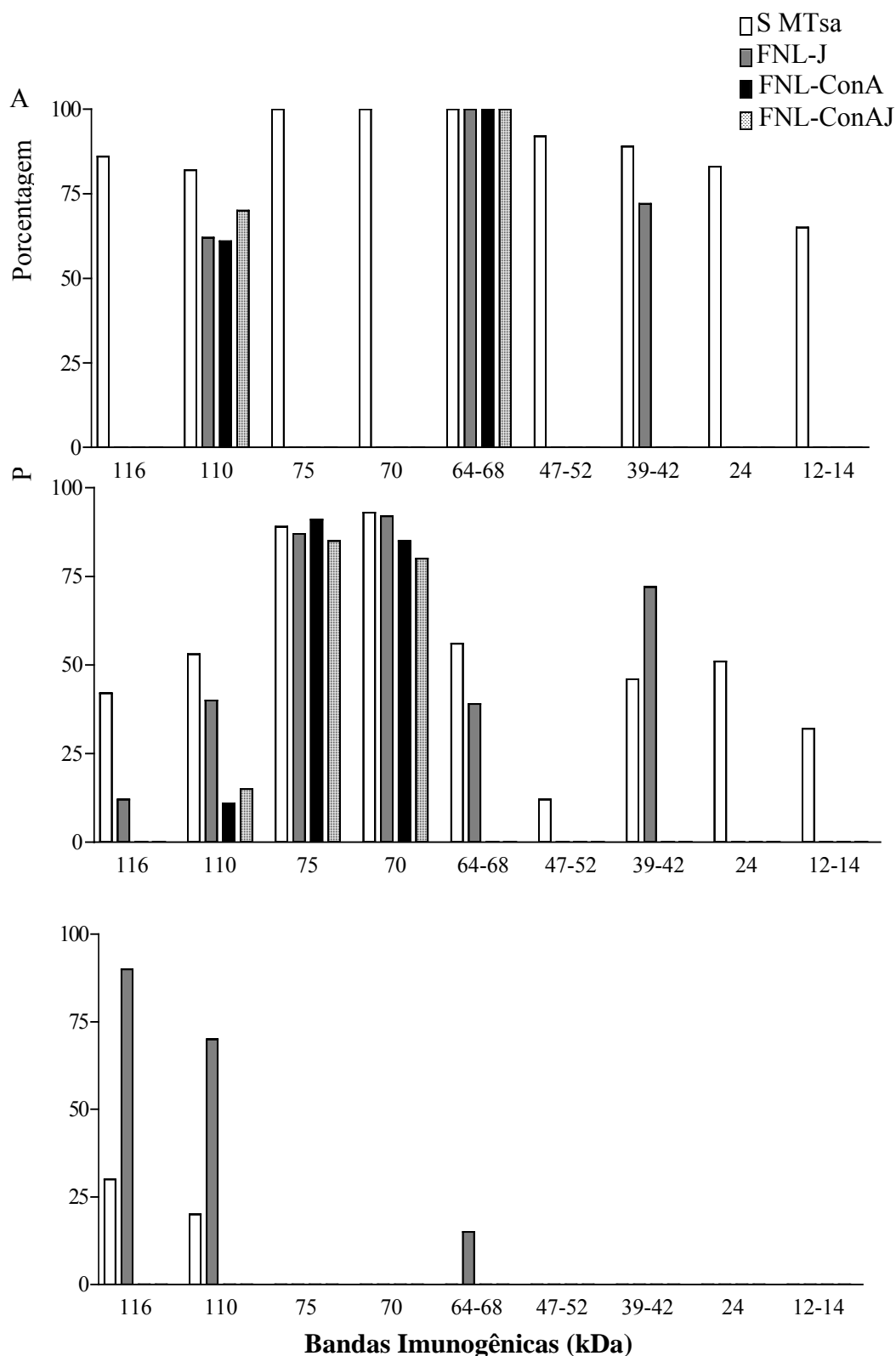


Figura 17. Porcentagem de reatividade das bandas imunogênicas reconhecidas pelo *immunoblotting* nas amostras de soro dos pacientes com neurocisticercose (A), pacientes infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (B) e indivíduos saudáveis (C) utilizando extrato salino total (S MTsa), fração não-ligante de jacalina (FNL-J) e de concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa, e fração não-ligante de concanavalina A obtida da fração não ligante de jacalina do extrato S MTsa (FNL-ConAJ).

4.4 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no líquido cefalorraquidiano utilizando S MTso, S MTsa e FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa

A análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no LCR frente ao antígeno homólogo S MTso, antígeno heterólogo S MTsa e a fração FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa em amostras de soro dos Grupos 4 e 5 está demonstrada na Figura 18. De acordo com os critérios da curva TG-ROC ficou definido para S MTso, S MTsa e FNL-ConA que todas as amostras com $IR > 1,2$ foram positivas.

A Figura 19 apresenta os níveis de IgG anti metacestódeos de *T. solium* no LCR e as porcentagens de positividade obtidos por ELISA frente ao S MTso, S MTsa e a fração FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa. As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados do teste ELISA utilizando S MTso, S MTsa e sua fração FNL-ConA frente às amostras de LCR de 35 pacientes com NC (Grupo 4) e 35 amostras de LCR de indivíduos com outras manifestações neurológicas (Grupo 5), respectivamente.

Os dados referentes à sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico e Índice Youden, obtidos por ELISA em LCR para as diferentes amostras antigênicas, estão demonstrados na Tabela 9. Os valores de p , comparando cada amostra antigênica, em cada grupo estão apresentados na Tabela 10.

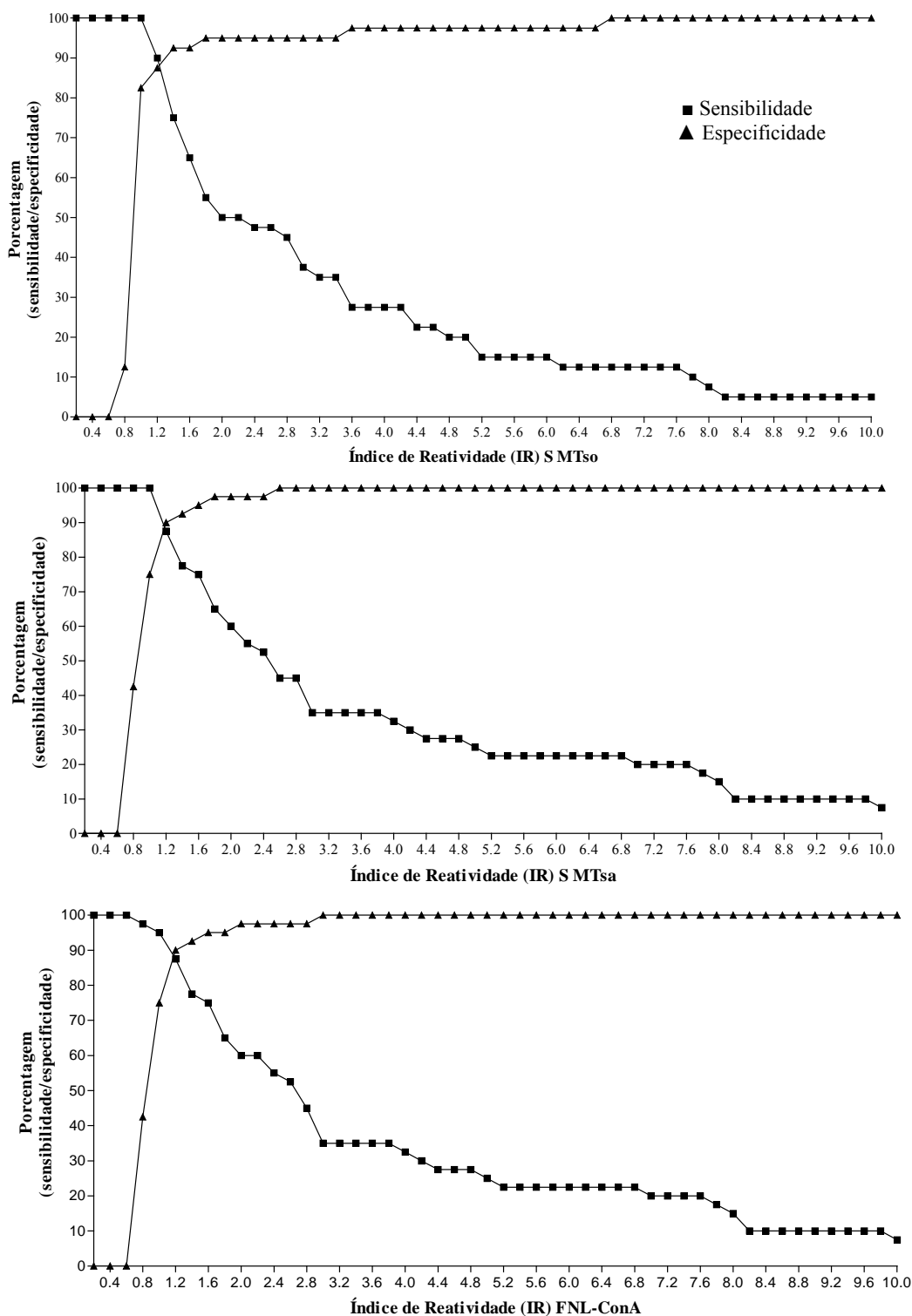


Figura 18. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no LCR frente ao extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso), extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e à fração não ligante de concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa. Amostras de LCR puras de indivíduos do grupo 4 (pacientes com NC, n=35) foram utilizadas para o cálculo de sensibilidade e de indivíduos do grupo 5 (indivíduos com outras desordens neurológicas, n=35) para o cálculo de especificidade.

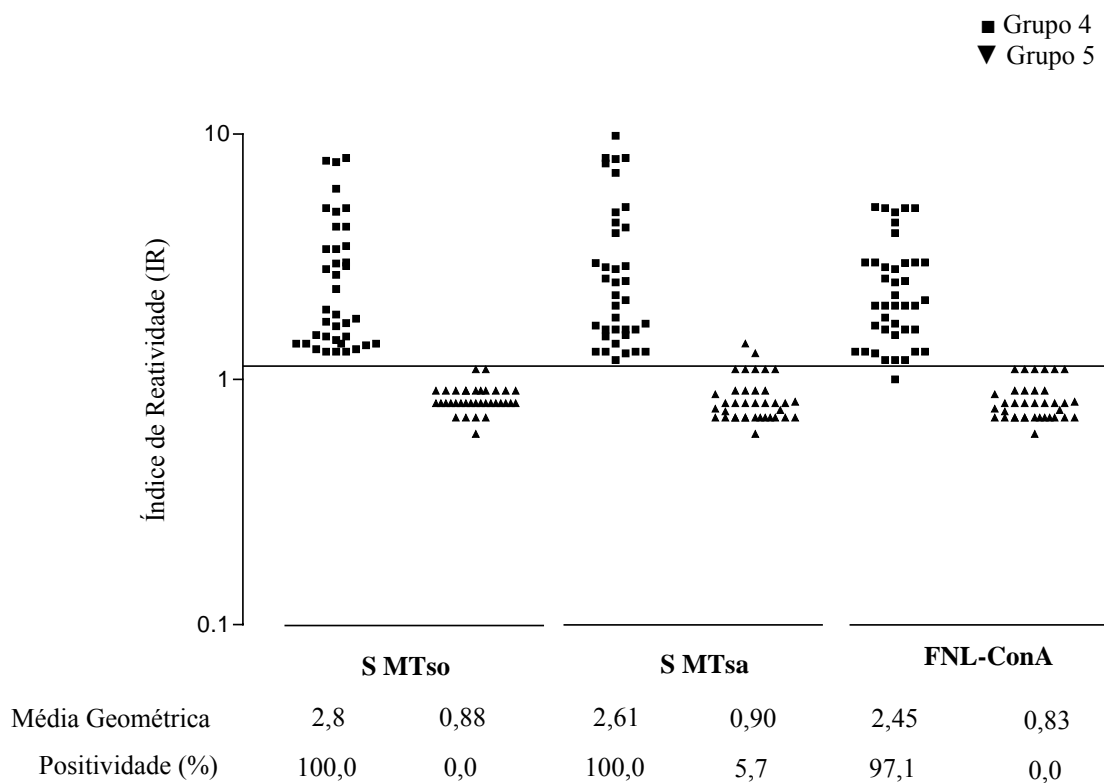


Figura 19. Níveis de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no LCR obtidos por ELISA frente ao extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso) e de *T. saginata* (S MTsa) e à fração não-ligante concanavalina A (FNL-ConA). Amostras de LCR puras dos indivíduos dos grupos: 4- neurocisticercose (n=35); 5- indivíduos com outras manifestações neurológicas (n=35) expressos em IR. A linha horizontal indica o IR=1,2; mg: média geométrica.

Tabela 7. Resultados do teste ELISA de 35 pacientes com neurocisticercose (Grupo 4), para detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de LCR, utilizando extrato salino total de metacésteos de *T. solium* (S MTso) e de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	ELISA		
			S MTso	S MTsa	FNL-ConA
1	M	25	+	+	+
2	M	23	+	+	+
3	M	24	+	+	+
4	F	30	+	+	-
5	F	21	+	+	+
6	F	22	+	+	+
7	F	24	+	+	+
8	M	62	+	+	+
9	F	24	+	+	+
10	F	26	+	+	+
11	F	34	+	+	+
12	F	25	+	+	+
13	M	53	+	+	+
14	M	19	+	+	+
15	F	23	+	+	+
16	M	17	+	+	+
17	F	35	+	+	+
18	M	22	+	+	+
19	F	36	+	+	+
20	M	51	+	+	+
21	F	23	+	+	+
22	M	34	+	+	+
23	F	25	+	+	+
24	M	26	+	+	+
25	F	19	+	+	+
26	M	24	+	+	+
27	F	25	+	+	+
28	F	23	+	+	+
29	M	29	+	+	+
30	F	27	+	+	+
31	F	19	+	+	+
32	F	20	+	+	+
33	M	25	+	+	+
34	F	24	+	+	+
35	F	22	+	+	+

F= Feminino; M= Masculino; + = Positivo; - = Negativo

Tabela 8. Resultados dos testes ELISA de 35 indivíduos com outras manifestações neurológicas (Grupo 5), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de LCR, utilizando extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso) e de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Desordem Neurológica	ELISA		
				S MTso	S MTsa	FNL-ConA
1	F	35	Cefaléia	-	-	-
2	F	33	Cefaléia	-	-	-
3	F	24	Cefaléia	-	-	-
4	F	30	Cefaléia	-	-	-
5	M	31	Cefaléia	-	-	-
6	M	22	Cefaléia	-	-	-
7	F	24	Cefaléia	-	-	-
8	M	40	Cefaléia	-	-	-
9	M	52	Cefaléia	-	-	-
10	F	26	Cefaléia	-	-	-
11	M	34	Cefaléia	-	-	-
12	M	56	Cefaléia	-	-	-
13	F	25	Cefaléia	-	-	-
14	M	19	Cefaléia	-	-	-
15	F	23	Cefaléia	-	-	-
16	F	27	Paresia	-	-	-
17	M	35	Paresia	-	-	-
18	M	22	Paresia	-	-	-
19	F	36	Paresia	-	-	-
20	M	41	Paresia	-	-	-
21	M	34	Paresia	-	-	-
22	F	35	Paresia	-	-	-
23	M	26	Meningite	-	-	-
24	F	19	Meningite	-	-	-
25	F	24	Meningite	-	-	-
26	F	25	Meningite	-	-	-
27	M	23	Meningite	-	-	-
28	M	29	Meningite	-	+	-
29	F	27	Crise Convulsiva	-	-	-
30	M	30	Crise Convulsiva	-	+	-
31	F	29	Crise Convulsiva	-	-	-
32	F	20	Tumor	-	-	-
33	M	35	Tumor	-	-	-
34	F	24	Esclerose múltipla	-	-	-
35	M	23	Esclerose múltipla	-	-	-

F= Feminino; M= Masculino; + = Positivo; - = Negativo

Tabela 9. 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 LCR, utilizando extrato salino total de metacésteos de *T. solium* (S MTso) e de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa.

Amostra antigênica	ELISA			
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED	Índice de Youden
S MTso	100,0	100,0	100,0	1
S MTsa	100,0	94,3	97,0	0,94
FNL-ConA	97,1	100,0	98,0	0,97

Tabela 10. Comparação dos diferentes extratos antigênicos para cada grupo estudado em relação aos valores de p obtidos a partir do número de sucessos em cada caso nos testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de LCR dos Grupos: 4 = pacientes com NC; 5 = indivíduos com outras manifestações neurológicas.

Extratos antigênicos	Grupo 4	Grupo 5
S MTso e S MTsa	$p = 1$	$p = 0,1515$
S MTso e FNL-ConA	$p = 0,1569$	$p = 1$
S MTsa e FNL-ConA	$p = 0,1569$	$p = 0,1515$

Extratos antigênicos: extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso); extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante concanavalina A (FNL-ConA) obtida do extrato S MTsa.

4.5 – Immunoblotting para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium* no líquido cefalorraquidiano utilizando S MTso, S MTsa e FNL-ConA obtida por cromatografia de afinidade do S MTsa

A Figura 20 demonstra o perfil de reconhecimento de bandas imunogênicas das amostras de LCR utilizando o antígeno homólogo S MTso, o antígeno heterólogo S MTsa e FNL-ConA obtida do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* (FNL-ConA) em amostras de pacientes com NC (Grupo 4) e indivíduos com outras manifestações neurológicas (Grupo 5). As porcentagens de reconhecimento das bandas imunogênicas no S MTso, S MTsa e na fração não-ligante de S MTsa (FNL-ConA) são demonstradas na Figura 21.

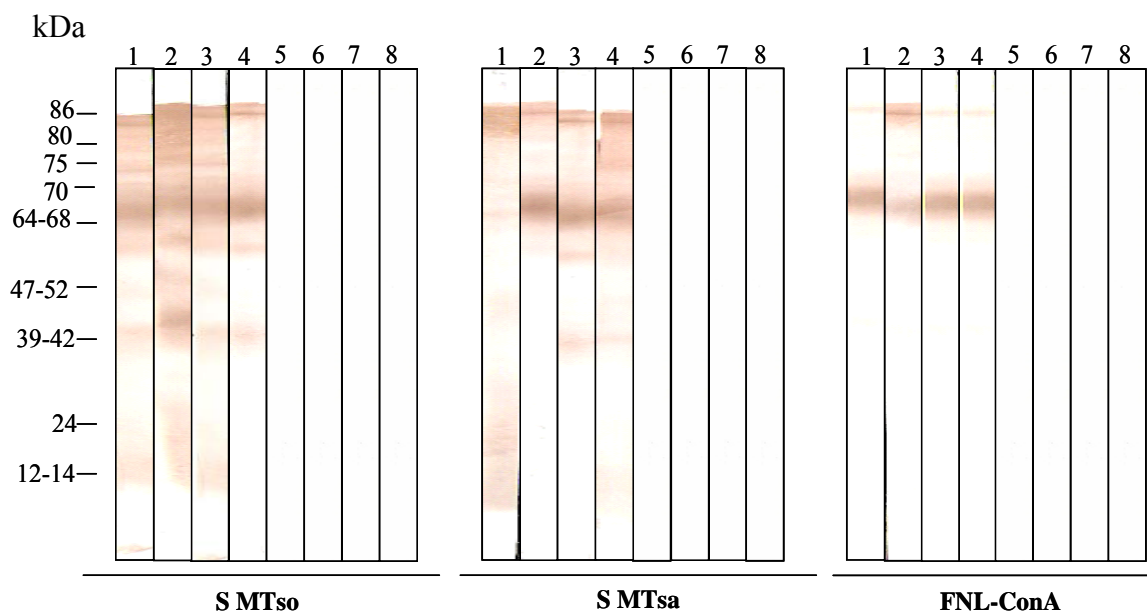


Figura 20 *Immunoblotting* utilizando amostras de LCR representativas frente ao extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso); extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante de concanavalina A de metacestódeos de *T. saginata* (FNL-ConA). Linhas de 1 a 4: pacientes com diagnóstico de NC. Linhas de 5 a 8: indivíduos com outras manifestações neurológicas.

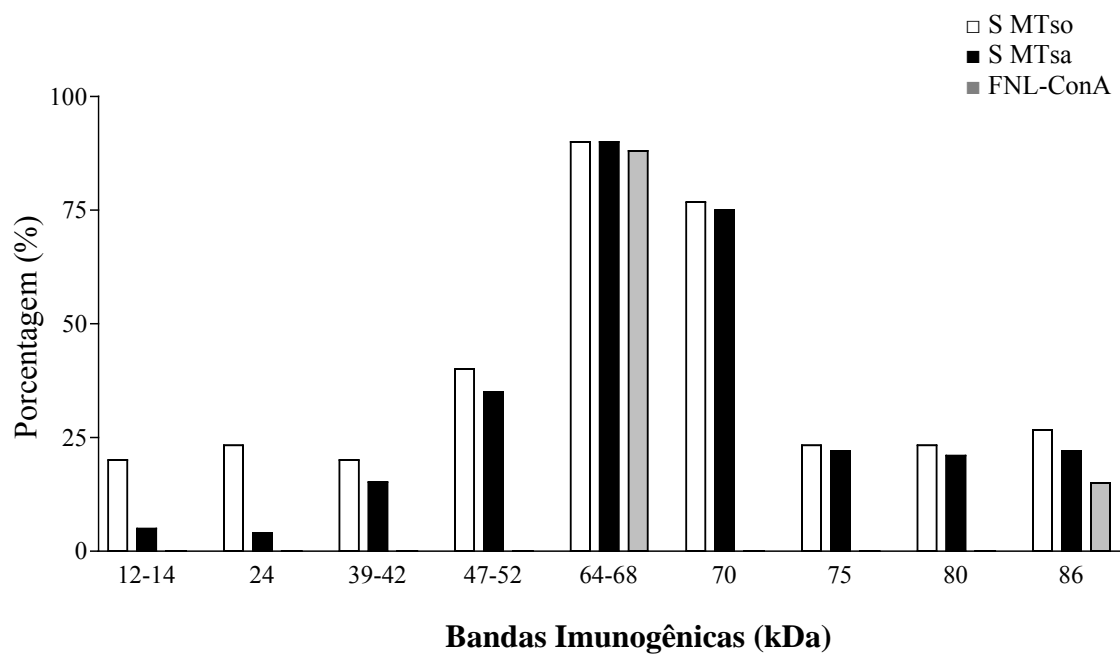


Figura 21. Porcentagem de reatividade das bandas imunogênicas reconhecidas pelo *immunoblotting* nas amostras de LCR dos pacientes com neurocisticercose comparando a utilização de extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (S MTso), metacestódeos de *T. saginata* (S MTsa) e fração não-ligante de concanavalina A de metacestódeos de *T. saginata* (FNL-ConA) obtidas do S MTsa.

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo as colunas de jacalina, concanavalina A e N-acetilglicosamina foram utilizadas pela primeira vez no fracionamento do extrato salino de formas metacestódeas de *T. saginata* (S MTsa) para o diagnóstico da NC humana.

As frações de interesse neste estudo foram as frações não ligantes, diferente dos resultados encontrados em cromatografia de afinidade do extrato salino de metacestódeos de *T. solium* em coluna de lentilha (RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997), na utilização de coluna de afinidade de jacalina no isolamento de imunoglobulinas (KABIR, 1998) e do isolamento de componentes glicosilados imunogênicos de *Blomia tropicalis* (ALMEIDA et al., 2006b). Os resultados encontrados demonstraram que as frações não possuem afinidade para as lectinas estudadas.

O fator preocupante no imunodiagnóstico da NC humana é a reatividade cruzada, principalmente com indivíduos infectados por *E. granulosus*. Os resultados encontrados demonstraram a existência de reatividade estágio-específica entre a hidatidose e a NC. A reatividade da forma cística destas manifestações clínicas se confirma inclusive pela alta sensibilidade do S MTsa e alta especificidade deste antígeno em relação à teníase por *T. saginata*, causada por parasito homólogo em fase adulta (OLIVEIRA et al., 2007).

Ao analisar a forma do metacestódeo, observou-se que a maior quantidade de glicoproteínas de membrana se encontrava na membrana translúcida externa do parasito, sendo o líquido de vesícula rico em antígenos de excreção e secreção. Foi encontrado 97% de homologia entre os antígenos de superfície de *T. solium*, *T. saginata* e *E. granulosus*. (GONZÁLEZ et al., 2007). Deste modo, as glicoproteínas que possuem afinidade às lectinas parecem ser mesmas glicoproteínas que intensificam a reatividade cruzada com *E. granulosus*, justificando assim a determinação das frações não ligantes como as de interesse neste estudo, para aumentar a sensibilidade dos testes imunológicos para NC humana.

Ambas as frações obtidas através de cromatografia de afinidade em coluna de N-acetil-glicosamina demonstraram baixa eficiência na detecção de anticorpos IgG anti-metacésteos de *T. solium*, em amostras representativas dos grupos, apresentando um perfil similar no reconhecimento destes anticorpos. Não foi observado reconhecimento de nenhuma proteína imunodominante, em nenhuma amostra testada inicialmente, quando as duas frações (FNL-N e FL-N) foram utilizadas na reação de *Immunoblotting*. Por este motivo as frações obtidas pela cromatografia de afinidade em coluna de N-acetil-glicosamina não foram utilizadas com o restante das amostras.

Na cromatografia de afinidade em coluna de jacalina, a FNL-J demonstrou alta especificidade no teste ELISA e o reconhecimento da banda imunodominante de 64-68 kDa pelo *Immunoblotting* nas amostras representativas testadas inicialmente. Sua fração ligante (FL-J) demonstrou altos níveis de reatividade no teste ELISA, tanto para as amostras de pacientes com NC como para indivíduos infectados por *E. granulosus*, evidenciando novamente as glicoproteínas antigênicas de superfície comuns entre estes parasitos. Sendo assim, a fração escolhida para testar o restante das amostras foi a FNL-J.

A FNL-ConA, obtida pela cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A, demonstrou alta sensibilidade e especificidade no teste ELISA e o reconhecimento da banda imunodominante de 64-68 kDa pelo *Immunoblotting* nas amostras representativas testadas inicialmente. Sua fração ligante (FL-ConA) demonstrou baixos níveis de reatividade no teste ELISA, tanto para as amostras de pacientes com NC como para indivíduos infectados por *E. granulosus*. Sendo assim, a fração escolhida para testar o restante das amostras foi a FNL-ConA.

Com o intuito de confirmar se as frações não ligantes possuíam carboidratos em comum que poderiam apresentar mesma reatividade, a FNL-J foi passada na coluna de afinidade de Con A. Como esperado, a FNL-ConAJ apresentou melhores resultados em

sensibilidade e especificidade no teste ELISA quando comparado à sua fração ligante. Foi observado o reconhecimento pelo *Immunoblotting* da banda imunodominante de 64-68 kDa, demonstrando que as frações não ligantes foram distintas quanto ao conteúdo glicoproteico obtido. Sendo assim, a fração escolhida para testar o restante das amostras foi a FNL-ConAJ.

No teste ELISA em amostras de soro, a FNL-ConA apresentou a mesma sensibilidade do extrato total (S MTsa) e significativamente maior que a FNL-J. A especificidade em indivíduos infectados por outros parasitos utilizando a FNL-ConA foi significativamente maior que o S MTsa e a FNL-J. A reatividade cruzada de indivíduos infectados com *E. granulosus* foi menor quando a FNL-ConA foi comparada com o S MTsa e a FNL-J. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto a sensibilidade e especificidade entre as frações FNL-ConA e FNL-ConAJ, apesar da menor reatividade de indivíduos do Grupo 1 frente a FNL-ConAJ, não necessitando de processos de purificação adicionais.

No teste ELISA, utilizando FNL-ConA, não foi observada reatividade cruzada em relação aos indivíduos infectados por *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* e *H. nana* ocorrida na utilização de S MTsa e FNL-J. A reatividade cruzada observada em um caso de *S. stercoralis* no teste ELISA utilizando a FNL-ConA pode estar relacionada com a infecção concomitante dos dois parasitos, uma vez que a região é considerada endêmica para as duas espécies (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998; SILVEIRA-LACERDA et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2006).

Na reação de *Immunoblotting*, utilizando FNL-ConA, o reconhecimento da banda imunodominante de 64-68 kDa foi altamente específico, caracterizando esta fração antigênica como específica para o sorodiagnóstico da NC humana.

A banda imunodominante (64-68 kDa) encontrada neste estudo com antígeno heterólogo obtido por cromatografia de afinidade parece não corresponder à (50 kDa) caracterizada em estudo com antígeno homólogo (HANCOCK et al., 2004; GARCIA et al.,

2005; MACHADO et al., 2007). Esta diferença foi observada também entre os extratos S MTso e S MTsa e pode estar associada com epítomos antigênicos específicos de cada espécie (OLIVEIRA et al., 2007). Esta variação também pode estar relacionada com a diferença no padrão de glicosilação das proteínas, interferindo em seu peso molecular.

A utilização de LCR continua sendo, atualmente, uma importante ferramenta no imunodiagnóstico da NC humana, uma vez que o reconhecimento de diferentes proteínas imunodominantes permitem diferenciar as formas ativas e inativas da doença (BARCELOS et al., 2007).

Alguns estudos utilizaram antígenos alternativos na detecção de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium* no LCR. Foi demonstrado que antígenos de metacestódeos de *T. crassiceps* substituem eficientemente os antígenos de parasitos suínos no imunodiagnóstico da NC (LARRALDE et al., 1989; VAZ; NUNES; PIAZZA, 1997; SUZUKI et al., 2007).

Apesar da padronização da utilização do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* no sorodiagnóstico da NC humana em amostras de soro (OLIVEIRA et al., 2007), até este estudo, nenhum dado havia sido publicado sobre a utilização deste extrato na detecção de anticorpos no LCR humano.

Na reação de *Immunoblotting* em LCR humano utilizando o antígeno homólogo (extrato salino das formas metacestódeas de *T. solium*) foi possível visualizar o reconhecimento de bandas imunodominantes de 86, 80, 75, 70, 64-68, 47-52, 39-42, 29-32, 24 e 12-14 kDa, resultado este em concordância com Barcelos et al. (2007). Ao utilizar o antígeno heterólogo (extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*) o padrão de reconhecimento foi para as seguintes bandas imunodominantes 86, 80, 75, 70, 64-68, 47-52, 39-42, kDa, mantendo o reconhecimento de importantes marcadores de fase ativa da NC humana, como as bandas de 70, 64-68, 47-52 kDa (BARCELOS et al., 2007). As amostras de LCR controle não reconheceram nenhuma proteína imunodominante neste estudo.

As amostras de LCR também foram testadas frente à fração purificada do extrato S MTsa (FNL-ConA) que demonstrou os melhores resultados em amostras de soro. Na fração FNL-ConA a principal banda imunodominante reconhecida foi a de 64-68 kDa, em concordância com os resultados sorológicos. No entanto a utilização desta fração purificada no imunodiagnóstico em amostras de LCR parece não ser essencial, uma vez que o extrato total S MTsa demonstrou 100% de especificidade na reação de *Immunoblotting*.

A utilização de indivíduos com outras manifestações neurológicas com controle de LCR para NC humana é justificável pela reatividade entre várias patologias neurológicas e pelos sintomas inespecíficos, como esclerose múltipla (RODRIGUEZ-URANGA et al., 2004), encefalites, meningites (HANDIQUE et al., 2008), tuberculose e neoplasias (GARG et al., 2008).

A análise das curvas de TG-ROC para os testes ELISA possibilitou a obtenção de um ponto de corte para cada amostra antigênica estudada para a reação em soro e LCR. Após a análise da sensibilidade e especificidade do teste utilizando os três diferentes antígenos (S MTso, S MTsa e FNL-ConA) não se observou diferença significativa entre os mesmos, destacando a possibilidade de utilização do antígeno heterólogo e sua fração purificada no imunodiagnóstico da NC em LCR.

O extrato S MTsa pode ser utilizado como antígeno alternativo no imunodiagnóstico em LCR da NC humana, pois não apresentou diferença tanto com o antígeno homólogo (S MTso) como com sua fração purificada (FNL-ConA), não justificando assim seu fracionamento adicional.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ Neste estudo foi possível fracionar o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina e concanavalina A, obtendo não ligantes com potencial aplicação para sorodiagnóstico da NC humana;
- ✓ Dentre as frações obtidas a FNL-ConA foi a mais sensível e específica pelo teste ELISA;
- ✓ A fração FNL-ConA e FNL-ConAJ foram os únicos extratos antigênicos, dentre todos os antígenos estudados, capazes de distinguir os pacientes com NC dos indivíduos infectados por *E. granulosus* na reação de *Immunoblotting* em amostras de soro, revelando o reconhecimento da banda específica de 64-68 kDa;
- ✓ O extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* pode ser utilizado como antígeno alternativo no imunodiagnóstico da NC humana em amostras de LCR no teste ELISA e na reação de *Immunoblotting*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABUNNA, F.; TILAHUN, G.; MEGERSA, B.; REGASSA, A.; KUMSA, B. Bovine cysticercosis in cattle slaughtered at Awassa municipal Abattoir, Ethiopia: prevalence, cyst viability, distribution and its public health implication. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v.55, n.2, p.82-88, 2008.
- AGAPEJEV, S. Aspectos clínicos-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.61, n.3-B, p.822-828, 2003.
- ALMEIDA, L.P.; MOREIRA, M.D.; REIS, D.O.; SANTOS, W. L.M. Cisticercose bovina: um estudo comparativo entre animais abatidos em frigoríficos com serviço de inspeção municipal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.6, n.2, p.2-20, 2002.
- ALMEIDA, C.R.; OJOPI, E.P.; NUNES, C.M.; MACHADO, L.R.; TAKAYANAGUI, O.M.; LIVRAMENTO, J.A.; ABRAHAM R.; GATTAZ, W.F.; VAZ, A.J.; DIAS-NETO, E. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. **European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience**, Berlin, v.256, n.5, p.307-310, 2006a.
- ALMEIDA, K.C.; SILVA, D.A.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; ALVES, R.; YNOUE, L.H.; RESENDE, R.O.; SUNG, S.J.; TAKETOMI, E.A. Responses of IgE, IgG1, and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.39, n.11, p.1445-1454, 2006b.
- 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, n.1, p.63-67, 1978.
- AROCKIA, J.A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S.K.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SURALIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the energetics of jacalin–sugar interactions: promiscuity versus specificity. **Journal of Molecular Biology**, London, v.347, n.1, p.181–188, 2005.
- BARBIERI, M.; FERNÁNDEZ, V.; GONZÁLEZ, G.; LUACES, V. M.; NIETO, A. Diagnosis evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hidatidosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.20, n.2, p.51-61, 1998.
- BARBOSA, A.P.; COSTA-CRUZ, J.M.; SILVA, S.A.; CAMPOS, D.M.B. Cisticercose: fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro, diagnóstico e soroprevalência. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.29, n.1, p.17-29, 2000.

* SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 157p.

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

BARCELOS, I.S.C.; MOURA, L.P.; COSTA, V.P.C.; FERREIRA, M.S.; COSTA-CRUZ, J.M. *Taenia solium* metacestodes immunodominant peptides recognized by IgG in cerebrospinal fluid and serum paired samples from patients with active and inactive neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.6, p.713-717, 2007.

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

BROTO, W. Aspectos neurológicos da cisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.5, n.1, p.258-294, 1947.

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.

BUCARDO, F.; MEZA-LUCAS, A.; ESPINOZA, F.; GARCÍA-JERÓNIMO, R.C.; GARCÍA-RODEA, R.; CORREA, D. The seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis among epileptic patients in Leon, Nicaragua, as evaluated by ELISA and western blotting. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.99, n.1, p.41-45, 2005.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A. Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.58, n.1, p.18-24, 2000.

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

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

CAI, X.; YUAN, G.; ZHENG, Y.; LUO, X.; ZHANG, S.; DING, J.; JING, Z.; LU C.K. Effective production and purification of the glycosylated TSOL18 antigen, which is protective against pig cysticercosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.76, n.2, p.767-770, 2008.

CAMPOS-OLIVAS, R.; HÖRR, I.; BORMANN, C.; JUNG, G.; GRONENBORN, A.M. Solution structure, backbone dynamics and chitin binding of the anti-fungal protein from *Streptomyces tendae* TU901. **Journal of Molecular Biology**, London, v.308, n.4, p.765-82, 2001.

CANELAS, H. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.20, n.1, p.1-16, 1962.

CARMO, R.G.; OLIVEIRA, J.V.; BANDINI, O.R. Prevalência de cisticercose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.45, p.45-50, 1997.

CASANOVA, S.C.; RIBEIRO, M.J.S.P.; GONÇALVES, R.R.; FARIA, L.C.; PERALTA, J.M.; PUCCIONI-SOHLER, M. Influence of cerebrospinal fluid laboratory parameters in the ELISA test for neurocysticercosis using a total cysticerci antigen. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.64, n.1, p.55-59, 2006.

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

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

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, n.1, p.15-31, 1986.

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

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

CUNNINGHAM, B.A.; WANG, J.L.; WAXDAL, M.J.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.250, n.4, p.1503-1512, 1975.

DECKERS, N.; KANOBANA, K.; SILVA, M.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; DORNY, P. Serological responses in porcine cysticercosis: a link with the parasitological outcome of infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, doi:10.1016/j.ijpara.2008.01.005, 2008.

DEGIORGIO, C.; PIETSCH-ESCUETA, S.; TSANG, V.C.W.; CORRAL-LEYVA, G.; NG, L.; MEDINA, M.T.; ASTUDILLO, S.; PADILLA, N.; LEYVA, P.; MATINEZ, L.; NOH, J.; LEVINE, M.; DEL VILLASENOR, R.; SORVILLO, F. Sero-prevalence of *Taenia solium*

cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.111, n.2 p.84-88, 2005.

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

DOOLITTLE, R. F. Proteins. **Scientific American**, New York, v.253, n.4, p.88-99, 1985.

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

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

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

EDDI, C.; KATALIN, B.; JUAN, L.; WILLIAM, A.; ANDREW, S.; DANIELA, B.; JOSEPH, D. Veterinary public health activities at FAO: cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, Amsterdam, v.55, S.305-308, 2006.

EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REECK, G.N.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.W.; WANG, J.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.69, n.9, p.2580-2584, 1972.

ELIAS, F.M.; MARTINS, M.T.; FORONDA, R.; JORGE, W.A.; ARAÚJO, N.S. Oral cysticercosis: case report and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.47, n.2, p.95-98, 2005.

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

FAN, P.C.; CHUNG, W.C. Sociocultural factors and local customs related to taeniasis in east Asia. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, Kaohsiung City, v.13, n.11, p.647-652, 1997.

FERREIRA, A.P.; VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; SASAKI, A.T.; FERREIRA, A.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 de São Paulo**, São Paulo, v.39, n.1, p.29-33, 1997.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.111, n.1, p.83-94, 2003.

- FERRER, E.; GONZÁLEZ, L.M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J.A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M.E.; CORTÉZ, M.M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R. M.E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.101, n.3, p.517-525, 2007.
- FLEURY, A.; BELTRAN, C.; FERRER, E.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; MICHAEL, R.; PARKHOUSE, E.; GARCIA, E.; FRAGOSO, G.; COSTA-CRUZ, J.; BIONDI, G.; AGAPEJEV, S; SCIUTTO, E. Application of synthetic peptides to diagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.8, n.12, p.1124-1130, 2003.
- FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.43-51, 2003.
- FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrilamida gels. **Analytical of Biochemistry**, Orlando, v.126, n.2, p.346-349, 1982.
- GALAN-PUCHADES, M.T.; FUENTES, M.V. The Asian *Taenia* and the possibility of cysticercosis. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v.38, n.1, p.1-7, 2000.
- GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. Imaging finding in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.71-78, 2003.
- GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, London, v.361, n.9383, p.547-556, 2003a.
- 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**, Amsterdam, v.57, n.4, p.227-236, 2003b.
- GARCIA, H.H.; DEL BRUTO, O.H.; NASH, T.E.; WHITE-JÚNIOR, 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**, Northbrook, v.72, n.1, p.3-9, 2005.
- GARG, R.K.; DESAI, P.; KAR, M.; KAR, A.M. Multiple ring enhancing brain lesions on computed tomography: an Indian perspective. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.266, n.1-2, p.92-96, 2008.
- GEKELER, F.; EICHENLAUB, S.; MENDOZA, E.G.; SOTELO, J.; HOELSCHER, M.; LÖSCHER, T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. **European Journal of Clinical and Microbiology Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.21, n.3, p.227-229, 2002.
- GENNARI-CARDOSO, M.L. **Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis* ligante de N-acetil-glicosamina interage com componente de matriz extracelular**. 2000. Tese de

Doutorado, Depto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2000.

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, n.3, p.51-59, 1980.

GOMES, I.; VEIGA, M.; EMBIRUÇU, E.K.; RABELO, R.; MOTA, B.; MEZA-LUCAS, A.; TAPIA-ROMERO, R.; CARRILLO-BECERRIL, B.L.; ALCANTARA-ANGUIANO, I.; CORREA, D.; MELO, A. Taeniasis and cysticercosis prevalence in a small village from northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.60, n.2-A, p.219-223, 2002.

GONZÁLEZ, A.E.; GARCÍA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.103-109, 2003.

GONZÁLEZ, L.M.; FERRER, E.; SPICKETT, A.; MICHAEL, L.M.; VATTA, A.F.; GÁRATE, T.; HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M. The *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus* spp. is immunogenic and 97% identical to its *Taenia solium* homologue. **Parasitology Research**, Berlin, v.101, n.6, p.1541-1549, 2007.

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

GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P.A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.185, n.1, p.123-132, 1995.

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

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

HANDA, U.; GARG, S.; MOHAN, H. Fine needle aspiration in the diagnosis of subcutaneous cysticercosis. **Diagnostic Cytopathology**, New York, v.36, n.3, p.183-187, 2008.

HANDIQUE, S.K.; DAS, R.R.; SAHARIA, B.; DAS, P.; BURAGOHAİN, R.; SAIKIA, P. Coinfection of Japanese encephalitis with neurocysticercosis: an imaging study. **American Journal of Neuroradiology**, Baltimore, v.29, n.1, p.170-175, 2008.

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

- HERMANSON, G.T.; MATTSON, G.R.; KROHN, R.I. Preparation and use of immunoglobulin-binding affinity supports on Emphaze beads. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.691, n.1-2, p.113-122, 1995.
- HERNÁNDEZ, M.; CABRERA-PONCE, J.L.;FRAGOSO, G.; LÓPEZ-CASILLAS, F.; GUEVARA-GARCIA, A.; ROSAS, G. LEÓN-RAMIREZ, C.; JUÁREZ, P.; SÁNCHEZ-GARCIA, G.; CERVANTES, J.; ACERO, G.; TOLEDO, A.; CRUZ, C.; BOJALIL, R.; HERRERA-ESTRELLA, L.; SCIUTTO, E. A new highly effective vaccine expressed in transgenic papaya. **Vaccine**, Amsterdam, v.25, n.21, p.4252-4260, 2007.
- HOBERG, E.P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, n.8, p.859-866, 2002.
- HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis *mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, New York, v.9, n.1, p.283-291, 1934.
- HUANG, H.; XIE, W.; CONG, A. Characteristics and antigungal activity of a chitin binding protein from ginkgo biloba. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.478, n.1-2, p.123-126, 2000.
- HUSAIN, N.; SHUKLA, N.; KUMAR, R.; HUSAIN, M.; CHATURVEDI, A.; AGARWAL, G.G.; GUPTA, R.K. ELISA in the evaluation of therapeutic response to albendazole in neurocysticercosis. **The Journal of Infection**, Kent, v.56, n.1, p.65-73, 2008.
- 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.; CRAIG, P. S. Response to Dorny et al.: immunodiagnostic approaches for detecting *Taenia solium*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.20, n.6, p.259-260, 2004.
- ITO, A.; NAKAO, M.; WANDRA, T. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. **The Lancet**, London, v.362, n.9399, p.1918-1920, 2003.
- ITO, A.; YAMASAKI, H.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; OKAMOTO, M.; SATO, M.O.; NAKAYA, K.; MARGONO, S.S.; IKEJIMA, T.; KASSUKU, A.A.; AFONSO, S.M. S.; ORTIZ, W.B.; PLANCARTE, A.; ZOLI, A.; GEERTS, S.; CRAIG, P. S. Multiple genotypes of *Taenia solium*- ramifications for diagnosis, treatment and control. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.95-101, 2003a.
- 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, n.1, p.3-17, 2003b.
- IUDICI-NETO, F.I.; PIANETTI-FILHO, G.; ARAÚJO, R.N.; NASCIMENTO, E. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semi-purified scolex antigen from *Taenia solium* cysticerci. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.40, n.2, p.163-169, 2007.

JEON, H.K.; KIM, K.H.; EOM, K.S. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Taenia saginata*: Comparison with *T. solium* and *T. asiatica*. **Parasitology International**, Amsterdam, v.56, n.3, p.243-246, 2007.

JIANG, J.L.; PENG, Y.; OIU, Y.; WANG, J. Effect of endogenous catecholamines on apoptosis of Con A-activated lymphocytes of rats. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.192, n.1-2, p.79-88, 2007.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit *Artocarpus heterophyllus*/seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.212, n.2, p.193-211, 1998.

KARANIKAS, I.D.; SAKELLARIDIS, T.E.; ALEXIOU, C.P.; SIAPERAS, P.A.; FOTOPOULOS, A.C.; ANTSAKLIS, G.I. *Taenia saginata*: a rare cause of bowel obstruction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.101, n.5, p.527-528, 2007.

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.

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

LANGE, O. O líquido cefalo-rachidiano na cisticercose do systema nervoso central. **Revista de Neurologia e Psiquiatria**, São Paulo, v.2, n.1, p.3-11, 1936.

LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.40, n.3, p.282-290, 1989.

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

LIMA, J.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; GARCIA, L.V.; LEITE, J.P. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v.217, n.1, p.31-35, 2004.

LINO-JÚNIOR, R.S.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) encefálica e cardíaca em necropsias. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.5, p.495-498, 1999.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, n.1, p. 35-67, 1986.

LIVRAMENTO, J.A. Contribution of immunofluorescent reactions in the cerebrospinal fluid to the study of neurocysticercosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.39, n.3, p.261-278, 1981.

LIVRAMENTO, J.A.; COSTA, J.M.; MACHADO, L.R.; NOBREGA, J.P.S.; SPINA-FRANÇA, A. ELISA (IgG and IgM) in CSF and serum in neurocysticercosis under treatment with praziquantel: comparison complement fixations reaction and immunofluorescence. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.43, n.3, p.267-274, 1985.

LOWRY, V.H.; ROSEBROUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, n.1 p.265-275, 1951

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, E.; COSTA-CRUZ, J. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n.2, p.161-164, 1998.

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

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.1369-1376, 2007.

MANHOSA, F.F.R. Prevalência de cisticercose bovina em animais abatidos no município de Tupã, SP (1992-1993). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.45, p.44-47, 1996.

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**, Malden, v.46, n.1, p.124-131, 2005.

MITTAL, A.; DAS, D.; IYER, N.; NAGARAJ, J.; GUPTA, M. Masseter cysticercosis - a rare case diagnosed on ultrasound. **Dento Maxillo Facial Radiology**, Tokyo, v.37, n.2, p.113-116, 2008.

MONTENEGRO, T.; GILMAN, R.; CASTILLO, R.; TSANG, V.; BRANOT, J.; GUEVARA, A.; SANABRIA, H.; VERASTEGUI, M.; STERLING, C.; MIRANDA, E. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Hymenolepis nana*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.36, n.4, p.327-334, 1994.

MONTRESOR, A.; PALMER, K. Taeniasis/cysticercosis trend worldwide and rationale for control. **Parasitology International**, Amsterdam, v.55, S.301-303, 2006.

MORAKOTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMOSONTHI, W.; KHAMBOONRUANG, C. Comparasion of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. **Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Public Health**, Bangkok, v.23, n.1, p.77-81, 1992.

MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cysticercozes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p.320-327, 1911.

MUKARATIRWA, S.; KASSUKU, A.A.; WILLINGHAM, A.L.; MURRELL, K.D. Background to the international action planning workshop on *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis with special focus on Eastern and Southern Africa. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.3-5, 2003.

MURRELL, K. D.; CROSS, J. H.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T. The importance of food-borne parasitic zoonoses. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.12, n.5, p.171-173, 1996.

NASH, T.E. Human case management and treatment of cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.61-69, 2003.

NGOWI, H.A.; CARABIN, H.; KASSUKU, A.A.; MLOZI, M.R.S.; MLANGWA, J.E.D.; WILLINGHAM III, A.L. A health-education intervention trial to reduce porcine cysticercosis in Mbulu District, Tanzania. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, doi:10.1016/j.prevetmed.2007.12.014, 2008.

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

NIGAM, S.; GHOSH, P.C.; SARMA, P.U. A new glycoprotein allergen/antigen with the protease activity from *Aspergillus fumigatus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.132, n.2, p.124-131, 2003.

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.

OLIVEIRA, H.B.; MACHADO, G.A.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, Berlim, v.101, n.4, p.1007-1113, 2007.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; ESTAÑOL, B. Immunopathogenesis of neurocysticercosis: is a damage mediated by the host immune response? **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.29, n.4, p.649-650, 1999.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. PAHO/WHO information consultation on the taeniasis/cysticercosis complex. Brasília, Brasil: **Pan American Health Organization**; 1997.

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

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

PARIJA, S.C.; SAHU, P.S.; DHANYA, H. Detection of cysticercus antigen and antibodies in cerebrospinal fluid of patients with chronic meningitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.49, n.5, p.331-334, 2007.

PAWLOWSKI, Z.S. Control of neurocysticercosis by routine medical and veterinary services. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.102, n.3, p.228-232, 2008.

PERES, L.C.; SAGGIORO, F.P.; DIAS JR, L.B.; ALVES, V.A.; BRASIL, R.A.; LUIZ, V.E.; NEDER, L.; ROSMAN, F.C.; FLEURY, R.N.; URA, S.; ORSI, A.T.; TALHARI, C.; FERREIRA, L.C.; RAMOS, S.G.; REY, L.C.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; SIM, F.; FILHO, O.E.; DUARTE, M.I.; LAMBERTUCCI, J.R.; CHIMELLI, L.M.; ROSA, P.S.; BELONE, A.F. Infectious diseases in paediatric pathology: experience from a developing country. **Pathology**, Surry Hills, v.40, n.2, p.161-175, 2008.

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

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

PRABHAKARAN, V.; RAGHAVA, M.V.; RAJSHEKHAR, V.; MULIYIL, J.; OOMMEN, A. Seroprevalence of *Taenia solium* antibodies in Vellore district, south India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.102, n.3, p.246-250, 2008.

PRASAD, A.; PRASAD, K.N.; YADAV, A.; GUPTA, R.K.; PRADHAN, S.; JHA, S.; TRIPATHI, M.; HUSAIN, M. Lymphocyte transformation test: a new method for diagnosis of neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.12.016, 2008.

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

PRETELL, E.J.; MARTINOT, C.J.; GARCIA, H.H.; ALVARADO, M.; BUSTOS, J.A.; MARTINOT, C. Differential diagnosis between cerebral tuberculosis and neurocysticercosis by magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Computer Assisted Tomography**, New York, v.29, n.1, p.112-114, 2005.

PREUX, P.M.; DRUET-CABANAC, M. Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan África. **Lancet Neurology**, London, v.4, n.1, p.21-31, 2005.

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.

QUEIROZ, R.P.V.; REIS, O.D.; SOUZA, R.M.; OLIVEIRA, A.L. A importância do diagnóstico da cisticercose bovina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.77, p.12-15, 2000.

RESTREPO, B.I.; OBREGÓN-HENAO, A.; MESA, M.; GIL, D.L.; ORTIZ, B.L.; MEJÍA, J.S.; VILLOTA, G.E.; SANZÓN, F.; TEALE, J.M. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestodes glycoprotein antigens. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.30, n.6, p.689-696, 2000.

REY, L. Cisticercose humana. In: **Parasitologia e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. p. 510-520.

RIGATTI, M.; TREVISOL-BITTENCOURT, P.C. Causas de epilepsia tardia em uma clínica de epilepsia do estado de Santa Catarina. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.57, n.3, p.787-792, 1999.

ROCA, C.; GASCÓN, J.; FONT, B.; PUJOL, T.; VALLS, M. E.; CORACHÁN, M. Neurocysticercosis and population movements: analysis of 23 imported cases in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, Wiesbaden, v.22, n.6 p.382-384, 2003.

RODRIGUES, L.V.C. Inspeção sanitária e critérios de julgamento da cisticercose bovina calcificada: infecção leve. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.23, n.3, p.339-344, 1993.

RODRIGUEZ-CANUL, R.; ALLAN, J.C.; FLETES, C.; SUTISNA, I.P.; KAPTI, I.N.; CRAIG, P.S. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.4, n.5, p.579-582, 1997.

RODRÍGUEZ-URANGA, J.J.; UCLÉS-SÁNCHEZ, A.J.; LÓPEZ-MUÑOZ, M.M.; SERRANO-CABRERA, A. Multiple sclerosis and neurocysticercosis: a diagnostic dilemma. **Revista de Neurologia**, Barcelona, v.38, n.9, p.832-836, 2004.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA binding lectin. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.134, n.3, p.1740-1743, 1985.

SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.137-143, 2003.

SASTRY, M.V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1----3)D-GalNAc). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.261, n.25, p.11726-11733, 1986.

SCHANTZ, P.M. Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. **Parasitology International**, Amsterdam, v.55, S.7-13, 2006.

SCHER, M.G; RESNECK, W.G.; BLOCH, R. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.177, n.1, p.168-171, 1989.

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

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; DE ALUJA, A.S.; HERNÁNDEZ, W.; ROSAS, G.; LARRALDE, C. Vaccines against cysticercosis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.8, n.5, p.415-423, 2008.

SEDER, R.A.; PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-production phenotype by CD4+ T cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.12, n.1, p.635-673, 1994.

SHARON, N. Lectins receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, New York, v.34, n.1, p.213-298, 1983.

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

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; MACHADO, E.R.; ARANTES, S.C.; 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.

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

SPINA-FRANÇA, A. Cisticercose do sistema nervoso central: considerações sobre 50 casos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v.48, n.1, p. 59-70, 1956.

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.

STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHÖHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.392, n.1, p.23-31, 2001.

SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.32, n.2, p.227-237, 1936.

SUZUKI, L.A.; ARRUDA, G.C.; QUAGLIATO, E.M.A.B.; ROSSI, C.L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.40, n.2, p.152-155, 2007.

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**, Amsterdam, v.55, S.111-115, 2006.

TERRAZA, S.; PUJOL, T.; GASCÓN, J.; CORACHÁN, M. Neurocysticercosis: an imported disease? **Medicina Clinica**, Barcelona, v.116, n.7, p.261-263, 2001.

THUSSU, A.; CHATTOPADHYAY, A.; SAWHNEY, I.M.; KHANDELWAL, N. Albendazole therapy for single small enhancing CT lesions (SSECTL) in the brain in epilepsy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London, v.79, n.3, p.238-239, 2008.

TOENJES, S.A.; KUHN, R.E. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. **Parasitology Research**, Berlin, v.89, n.5, p.407-413, 2003.

TOLEDO, A.; FRAGOSO, G.; ROSAS, G.; HERNANDEZ, M.; GEVORKIAN, G.; LOPEZ-CASILLAS, F.; HERNANDEZ, B.; ACERO, G.; HUERTA, M.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.69, n.3, p.1766-1773, 2001.

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

TRINDADE, M.B.; LOPES, J.L.S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1764, n.1, p.146-152, 2006.

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

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. p.85-114.

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.E.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients

with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Miami, v.57, n.3, p.354-357, 1997.

VERASTEGUI, M.; GILMAN, R.; GONZALES, A.; GARCIA, H.; GAVIDIA, C.; FALCON, N.; BERNAL, T.; ARANA, Y.; TSANG, V. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.108, n.1, p.49-62, 2002.

VIANNA, L.G.; MACEDO, V.; COSTA, J.M. Cisticercose músculo-cutânea e visceral – doença rara? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, n.2, p.129-136, 1991.

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

VIANNA, L.G.; COSTA-CRUZ, J.M.; MACEDO, V.; SOUZA, D.; MOREIRA, D.G. Estudo comparativo dos testes imunoenzimáticos ELISA-G e ELISA-M, imunofluorescência indireta e fixação de complemento no diagnóstico da cisticercose humana. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v.50, n.3, p.302-308, 1992.

WEINBERG, M. Recherche des anticorps spécifiques dans la distomose et al cysticercose. **Comptes Rendus de la Société de Biologie**, Paris, v.66, n.1, p.219-221, 1909.

WU, A.; WU, J.H.; LIN, L.; LIN, S.; LIU, J. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). **Life Sciences**, Oxford, v.72, n.20, p.2285-2302, 2003.

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

YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, New York, v.3, n.1, p.32-35, 1950.

YU, L.; HUANG, M.; WANG, P.G.; ZENG, X. Cross-linked surface-grafted glycopolymer for multivalent recognition of lectin. **Analytical Chemistry**, Washington, v.79, n.23, p.8979-8986, 2007.

ZAMPIM, L.M. Cisticercose bovina no Paraná no período de 1982-1988. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.30, p.24-25, 1994.