



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

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR**  
**IMUNOGLOBULINAS Y ANTI-METACESTÓDEO DE**  
*Taenia solium* **POR PHAGE DISPLAY**

**Marianna Nascimento Manhani**

Uberlândia - MG  
Fevereiro - 2009



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

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR  
IMUNOGLOBULINAS Y ANTI-METACESTÓDEO DE  
*Taenia solium* POR *PHAGE DISPLAY***

Dissertação submetida ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como requisito parcial para obtenção de  
título de Mestre.

Marianna Nascimento Manhani  
(mestranda)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Julia Maria Costa Cruz  
(orientadora)

Uberlândia - MG  
Fevereiro – 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

M277s Manhani, Marianna Nascimento, 1984-  
Seleção de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas Y anti-metacestódeo de *Taenia solium* por phage display / Marianna Nascimento Manhani. - 2009.  
98 f. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Neurocisticercose - Parasito - Teses. 2. Taenia - Teses.. I. Costa-Cruz, Julia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 616.8-008.89

**Segunda Folha de Rosto (Fornecida pela Secretaria do PPIPA)**

***Dedicatória***

*À minha família, ao meu namorado e aos meus amigos.*

## **Agradecimentos**

*A Deus pelos tons concedidos que me permitiram enfrentar todos os desafios e aprender uma nova lição de vida a cada vitória.*

*À minha orientadora **Prof. Dra. Julia Maria Costa-Cruz** pelos conselhos e orientações durante todo o trabalho.*

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

*À **Vanessa da Silva Ribeiro**, que passou comigo todos os momentos de angústia, frustrações, alegrias e sucesso, que enfrentei durante o Mestrado. E também pelo auxílio técnico e metodológico durante o estudo.*

*Ao **Dr. Rone Cardoso**, pela prontidão de ajudar no entendimento, realização e análise dos métodos moleculares da pesquisa.*

*Às técnicas **Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires**, que me auxiliou na obtenção das amostras e na metodologia sobre os testes imunológicos, e **Maria das Graças Marçal**, ajudando nos testes parasitológicos.*

*Aos amigos do Laboratório, **Rosângela Maria Rodrigues, Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Nágilla Daliane Feliciano, Talita Lucas Belizário, Henrique Tomaz Gonzaga**, pelos momentos de descontração e por tantas vezes me tranquilizarem quando as coisas saíam errado.*

*A todos os **profissionais do Laboratório de Parasitologia** por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse possível.*

*Aos **funcionários do Laboratório de Análises Clínicas**, pela coleta de algumas amostras.*

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

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. <i>TAENIA SOLIUM</i> E NEUROCISTICERCOSE.....	9
1.1.1. Classificação taxonômica, morfologia e ciclo de vida.....	9
1.1.2. Neurocisticercose: Aspectos clínicos .....	11
1.1.3. Neurocisticercose: Diagnóstico e tratamento .....	15
1.1.4. Neurocisticercose: Epidemiologia e Controle .....	22
1.2. EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS (PHAGE DISPLAY) E SELEÇÃO BIOLÓGICA (BIOPANNING).....	27
1.3. ANTICORPO IGY .....	32
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. OBJETIVOS GERAIS: .....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	38
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL DE METACESTÓDEOS DE <i>TAENIA SOLIUM</i> .....	38
3.3. IMUNIZAÇÃO DE AVES .....	38
3.3.1. Purificação dos anticorpos.....	40
3.3.2. ELISA para confirmar a especificidade da IgY .....	40
3.4. PHAGE DIPLAY – EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS - E BIOPANNING - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS .....	41
3.5. SEQÜENCIAMENTO DE DNA DOS BACTERÍOFAGOS .....	43
3.6. AMOSTRAS DE SORO .....	44
3.7. TESTE ELISA DOS PEPTÍDEOS CONTRA SORO HUMANO ESPECÍFICO .....	45
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3.9. ANÁLISE DE DADOS POR BIOINFORMÁTICA .....	46
3.10. NORMAS DE BIOSSEGURANÇA.....	46
4. RESULTADOS .....	47
4.1. IMUNIZAÇÃO DE AVES .....	47
4.2. PHAGE DIPLAY – EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS - E BIOPANNING - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS .....	48
4.2.1. Purificação dos anticorpos.....	48

4.2.2. ELISA para confirmar a especificidade da IgY .....	49
4.3. BIOPANNING – SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS.....	50
4.4. SEQÜENCIAMENTO DE DNA DOS BACTERIÓFAGOS .....	51
4.5. TESTE ELISA DOS PEPTÍDEOS CONTRA SORO HUMANO ESPECÍFICO .....	52
4.6. ANÁLISE DE DADOS POR BIOINFORMÁTICA .....	59
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES .....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82



## RESUMO

Os metacestódeos de *Taenia solium* no homem instalam-se principalmente no sistema nervoso central (SNC) causando neurocisticercose (NC), a parasitose mais freqüente do SNC. A apresentação patológica da NC difere em relação à localização e viabilidade do cisticerco, e mecanismos da resposta imunológica. Para estabelecer o diagnóstico de NC é necessária uma interpretação correta dos sintomas clínicos, dos testes de neuroimagem e de imunodiagnósticos, e dos dados epidemiológicos. A freqüente indisponibilidade de material do parasito tem estimulado o desenvolvimento e uso de antígenos recombinantes nas análises imunodiagnósticas, e desde a descrição da tecnologia de *phage-display* esta técnica tem apresentado uma utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências, como a de definir peptídeos para testes imunodiagnósticos. O objetivo deste estudo foi o isolamento de mimetopos de metacestódeos de *T. solium* a partir da realização de *biopanning* utilizando IgY anti-metacéstodeo de *T. solium*. A IgY, obtida através da imunização de galinhas com extrato salino de metacéstodeos de *T. solium*, foi adsorvida em poços de microplacas para selecionar peptídeos a partir de uma biblioteca de fagos em três *rounds* de *biopanning*. Os fagotopos selecionados foram testados para o diagnóstico de NC através de ensaio de ELISA com 110 amostras de soro, sendo 40 de pacientes com NC e com outras doenças parasitárias, e 30 amostras de indivíduos saudáveis. Sete mimetopos apresentaram os melhores resultados no diagnóstico da NC, e foram capazes de diferenciar a forma ativa da forma inativa de NC, detectando aproximadamente 100% dos pacientes com a forma inativa. Nenhum dos clones foi reativo com soros de pacientes com *Echinococcus granulosus*, e a especificidade variou de 85,7% a 94,3%. Esse trabalho foi o primeiro a utilizar a imunização de galináceos com extrato salino de metacestódeos de *T. solium*. Os clones Cc6, Cc8, Cc25, Cc27, Cc30, Cc45 e Cc48, apresentaram os melhores resultados, podendo ser considerados como potenciais marcadores de fase inativa e uma ferramenta útil no prognóstico da doença, e também um reforço para os testes de neuroimagem.

**Palavras-chave:** neurocisticercose; fase ativa; fase inativa; *phage-display*; *biopanning*; IgY.

## ABSTRACT

The *Taenia solium* metacestodes localization in humans occurs mainly in the central nervous system (CNS) promoting the disease named neurocysticercosis (NC), the most frequent parasitosis in the CNS. The pathological presentation of NC differs about localization and viability of metacestodes, and host immunological response. For its diagnosis establishment is necessary a right interpretation of clinical signs, neuroimaging and immunological tests, and epidemiological data. The frequent inavailability of parasite material has stimulated the development and usage of recombinant antigens in the immunodiagnosis, and since description of the *phage-display* technology this technique has presented increased utilization in several scientific areas, as selection of peptides that could be used for immunodiagnostic test. The aim of this study was to obtain mimetopes of *T. solium* through biopanning using IgY specific to *T. solium* metacestodes. The IgY obtained from immunized chicken with *T. solium* metacestodes saline extract was coated on microplate wells to select peptides from phage library in a three rounds biopanning. The phagetopes selected were tested in NC diagnosis by ELISA assay with 110 serum samples, 40 from NC patients and patients infected with others parasitic diseases, and 30 samples of health individuals. Seven mimetopes shown the best results in diagnostic patients with NC, and also they were capable to distinguish active from inactive NC form, detecting almost even 100% of inactive NC patients. None of the clones reacted with *Echinococcus granulosus* sera and the specificity ranged from 85.7% to 94.3%. This study was the first utilizing chicken immunization using *T. solium* metacestodes saline extract. The phage clones Cc6, Cc8, Cc25, Cc27, Cc30, Cc45 e Cc48, shown the better results, can be potential candidates as NC inactive phase markers and a useful tool in disease prognostic, and reinforcement to neuroimaging tests.

**Keywords:** neurocysticercosis; active phase; inactive phase; phage-display; biopanning; IgY.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *TAENIA SOLIUM* E NEUROCISTICERCOSE

#### 1.1.1. Classificação taxonômica, morfologia e ciclo de vida

Devido suas características, a espécie *Taenia solium*, pertence à família Taeniidae; ordem Cyclophyllidea, caracterizada por parasitos encontrados no intestino delgado com escólex possuindo quatro ventosas com ou sem rostro; classe Cestodea ou Cestoda, devido à presença de órgão de fixação na porção anterior, o escólex, também por apresentar o corpo segmentado em proglótes e oncosfera ou embrião hexacanto; e filo Platyhelminthes, por ter simetria bilateral, corpo achatado dorso-ventralmente e ser hermafrodita. Dentre a família Taeniidae as espécies *T. solium* e *Taenia saginata* possuem grande importância médica por terem o homem como único hospedeiro definitivo, além da ampla distribuição geográfica (REY, 2001).

A espécie *T. solium* é considerada um sério problema de saúde humana e animal (CARABIN et al., 2006; WILLINGHAM; ENGELS, 2006). Este parasito é zoonótico, com o suíno como o hospedeiro intermediário (HI) primário, albergando o estágio metacestódeo, e sendo o ser humano o único hospedeiro definitivo (HD) natural, por desenvolver a forma adulta no intestino delgado. Os seres humanos podem também desenvolver a forma metacestódea, causando a cisticercose humana (PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005).

O suíno atua como HI por ingerir alimentos contaminados com ovos ou proglótes grávidas liberadas juntas com as fezes humanas (HAWK et al., 2005; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006). Os ovos são bastante resistentes, podendo permanecer viáveis por mais de oito meses sob condições ambientais adequadas (locais quentes e úmidos), aumentando assim a possibilidade de transmissão (PÊSSOA; MARTINS, 1982).

No estômago ou intestino delgado do animal, os ovos se rompem, liberando o embrião hexacanto, também conhecido como oncosfera, que é ativado pelos ácidos e enzimas do estômago. O embrião hexacanto, então, penetra no intestino delgado e é distribuído hematologicamente aos músculos somáticos, olhos e ao sistema nervoso central (SNC) do suíno, desenvolvendo-se na forma metacestódea (HAWK et al., 2005; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

O metacestódeo possui forma ovóide e consiste de uma vesícula translúcida, medindo aproximadamente 1 a 3 cm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, repleta de fluido ou líquido vesicular esbranquiçado e com um escólex invaginado (ALARCÓN, 2006; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006). O cisticercos pode apresentar-se sob duas formas: a cística ou *Cysticercus cellulosae*, apresentando vesícula contendo escólex em seu interior e, na forma de *Cysticercus racemosus* ou em cachos, com inúmeras vesículas, mas sem o escólex, denominada também de forma racemosa (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Quando a carne suína mal cozida ou crua contendo o metacestódeo é ingerida pelo homem, este alcança o intestino delgado, onde ocorre a evaginação do escólex e sua adesão à mucosa intestinal e o desenvolvimento do estróbilo a partir da região do pescoço ou colo. O escólex piriforme apresenta quatro ventosas e rostro armado com dupla coroa de acúleos, com número variando entre 25 a 50 (REY, 2001). Em três a quatro meses, o parasito adulto alcança maturidade, resultando na teníase (HAWK et al., 2005; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

O parasito adulto habita exclusivamente o intestino delgado humano. Esta forma evolutiva é um verme comprido e achatado que mede aproximadamente dois a quatro metros (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005) e é constituído de um grande número de proglotes e este número varia de 800 a 900 por parasito, que juntas constituem o estróbilo. As proglotes apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas (REY, 2001; GARCIA et al., 2002). As últimas proglotes são liberadas juntamente com as fezes, sendo que cada uma destas proglotes contêm aproximadamente 50.000 ovos (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Apesar de o suíno ser o HI primário de *T. solium*, o ser humano pode se converter em hospedeiro intermediário acidental deste cestódeo. A cisticercose humana ocorre quando há a ingestão de ovos, que são eliminados junto com as fezes de um indivíduo albergando o parasito adulto, isto é, com teníase. Apesar de o contágio da cisticercose ter sido atribuído principalmente à heteroinfecção através da ingestão de água e alimentos contaminados, estudos epidemiológicos recentes sugerem que o contágio mais comum é através da via fecal-oral (autoinfecção externa) devido à presença de um portador assintomático de *T. solium*, especialmente se o portador não mantém boas medidas de higiene e sendo ele um manipulador de alimentos (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006). Alternativamente, aqueles indivíduos com a forma adulta do parasito podem se autoinfectar devido uma reversão no peristaltismo, assim os ovos ou proglóte regurgitados no estômago

são estimulados a liberar o embrião hexacanto e iniciar o ciclo semelhante ao que ocorre no suíno (HAWK et al., 2005).

A localização dos metacestódeos no suíno acomete principalmente os músculos estriados, no homem os locais mais comuns de infecção incluem sistema nervoso central (SNC), tecido subcutâneo, músculo esquelético, coração, pulmão, osso, cordão espinhal e eventualmente a cavidade oral (SOBNACH et al., 2009). O SNC revela-se como a localização mais importante por sua frequência e gravidade, sendo relatado que 90% dos casos de cisticercose são da forma cerebral (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

### 1.1.2. Neurocisticercose: Aspectos clínicos

Os metacestódeos são rapidamente destruídos pelo sistema imunológico do hospedeiro humano na maioria das circunstâncias, exceto para aqueles localizados em locais imunologicamente privilegiados, como olhos e SNC. A infecção do SNC com formas metacestódeas de *T. solium* é denominada como neurocisticercose (NC) (ALARCÓN, 2006; DUA; ANEJA, 2006). A NC é a parasitose mais frequente do SNC (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006), e apresenta diversos processos patológicos que diferem devido à localização e viabilidade do cisticercos, mecanismos de agressão e resposta imunológica do hospedeiro, além disso, a intensidade varia de acordo com três parâmetros: o parasito, interface parasito-hospedeiro e o tecido do hospedeiro (LINO-JUNIOR et al., 2007).

No cérebro, as vesículas alcançam desde poucos milímetros a 1 ou 2 cm, mas há ocasiões em que podem crescer vários centímetros de diâmetro. Sua localização mais frequente é nos hemisférios cerebrais ou parênquima cerebral. Com menos frequência podem localizar-se nos gânglios basais, no cerebelo, excepcionalmente no tronco cerebral, assim como nos ventrículos, no espaço subaracnóideo e no cordão medular. Os metacestódeos podem ser únicos ou múltiplos, e chegam, em alguns casos, a centenas (ALARCÓN, 2006). Os cisticercos parenquimatosos são pequenos e localizam-se geralmente no córtex cerebral ou nos gânglios da base, devido sua grande vascularização (DEL BRUTTO, 2005).

A NC subaracnóidea pode localizar-se dentro dos sulcos corticais, nas fissuras de Silvio, nas cisternas da base ou nas cisternas que rodeiam o tronco cerebral. Os metacestódeos subaracnóideos corticais tendem a ser pequenos, enquanto que aqueles localizados nas cisternas do líquido cefalorraquidiano (LCR) podem alcançar um tamanho de 50 mm ou mais. Em alguns destes parasitos não se identifica o escólex, devido à formação composta por várias membranas aderida umas as outras (forma racemosa). Os metacestódeos ventriculares podem

ser pequenos ou grandes, apresentam escólex, e localizam-se preferencialmente no IV ventrículo (DEL BRUTTO, 2005; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). Os metacestódeos podem também localizar-se no espaço subdural, na região selar, na medula espinhal e no espaço subaracnóideo extramedular. Os cisticercos espinhais se localizam no espaço subaracnóideo ou no parênquima medular, e seu aspecto macroscópico é similar aos daqueles localizados no cérebro (DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006).

Uma vez estabelecido no espaço intraparenquimatoso, o metacestódeo evade o sistema imunológico utilizando vários mecanismos, incluindo inibição do complemento, liberação de citocinas, e mimetismo através de imunoglobulinas do hospedeiro. Deste modo, são observadas somente mínimas alterações inflamatórias no tecido circundante (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005). Neste estágio os metacestódeos são considerados viáveis e compreendem-se de vesículas preenchidas de líquido com densidade igual ao do LCR, sendo denominado de estágio vesicular podendo apresentar escólex invaginado (DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006). Este estágio vesicular inicia o processo degenerativo quando o sistema imune do hospedeiro e a resposta inflamatória ultrapassam os mecanismos de evasão, resultando na morte do parasito (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005). Os estágios pelos quais os cisticercos atravessam até a sua destruição compreendem: estágio coloidal, estágio granular e estágio calcificado (SOTELO; GUERRERO; RUBIO, 1985). No primeiro estágio de degeneração, identificado como estágio coloidal, o líquido vesicular se torna opaco e denso e o escólex mostra sinais de degeneração. Esta lesão se encontra rodeada de uma cápsula de colágeno grossa e irregular, e o tecido ao redor mostra gliose astrocítica e edema difuso. Posteriormente, a parede se engrossa e o escólex se transforma em grânulos mineralizados ou forma granulosa, conhecida como estágio granular. No estágio final, ou calcificado, o parasito aparece como um módulo mineralizado (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006).

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

As manifestações clínicas da NC são dependentes do número, tamanho, localização e estágio de desenvolvimento do metacestódeo, assim como da resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito. Portanto, não há manifestações patognomônicas ou típicas da síndrome de NC (ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

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

Quando os metacestódeos estão localizados externamente ao parênquima cerebral, há uma tendência ao crescimento irregular e desenvolvimento da resposta inflamatória mais grave (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005).

A localização do metacestódeo no sistema ventricular pode causar, em 10 – 20% dos casos, hipertensão intracranial aguda secundária à hidrocefalia. Tal sinal está diretamente relacionado com a obstrução do fluxo do LCR causada pelo parasito ou por reação inflamatória. Quando localizada no IV ventrículo, a NC causa hidrocefalia subaguda que pode estar associada com sinais de disfunção cerebral devido à compressão do IV ventrículo. Manifestação de hidrocefalia aguda intermitente com violenta dor de cabeça, ataque de vertigem posicional, ou perda da consciência induzidas por movimentos abruptos da cabeça (síndrome de Brun), ou mesmo morte, pode ser resultado da presença de metacestódeo ventricular móvel (ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

Metacestódeos no espaço subaracnóideo podem alcançar vários centímetros de diâmetro, cistos gigantes, causando hipertensão intracranial com hemiparesia, ataques parciais ou outros sinais neurológicos focais. Estes parasitos podem ainda invadir as cisternas da base, levando ao desenvolvimento da forma racemosa (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

O pior prognóstico da NC está associado com a NC subaracnóidea da base, na qual vesículas nas cisternas do LCR crescem de maneira desorganizada, infiltram estruturas vizinhas, e estão associadas com grave resposta inflamatória local, com alta concentração de proteína e contáveis células no LCR (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005). A meningite subaguda, devido a NC subaracnóidea, provoca intensa reação inflamatória no espaço subaracnóideo. Isto está relacionado à intensa reação inflamatória que conduz para espessamento das leptomeninges da base do cérebro (ALARCÓN, 2006; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). O espessamento leptomeníngeo pode obstruir a circulação do LCR em

aproximadamente 50 – 60% dos casos, resultando em hidrocefalia e hipertensão intracranial progressiva, e mortalidade em mais de 20% dos pacientes (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

A encefalite cisticercóide é mais freqüente em crianças e mulheres jovens, e se caracteriza por deterioração da consciência, crises convulsivas, diminuição da visão, cefaléia, vômito e papiledema (DEL BRUTTO, 2005).

O aumento da leptomeninge pode também comprimir os vasos sanguíneos do polígono de Willis, que juntamente com aracnoidite podem condicionar a oclusão completa de um vaso sanguíneo com subsequente infarto (ALARCÓN, 2006).

Envolvimento do cordão espinhal é raro, sendo responsável por 1 – 5% dos casos de NC. Os sinais clínicos podem ser causados diretamente pela compressão do cordão espinhal e/ou movimentos do metacestódeo ou, indiretamente, devido à reação inflamatória, induzindo progressiva paralisia. Cisticercose espinhal intramedular, intradural, extramedular, e extradural podem apresentar radiculopatia ou mielopatia (HAWK et al., 2005; TAKAYANAGUI, ODASHIMA, 2006).

Aproximadamente 50% dos casos de NC são assintomáticos ou clinicamente silenciosos. Além disso, o curso da doença sintomática e a resposta inflamatória do hospedeiro são altamente variáveis. O fenótipo resistente é proposto ser composto por aqueles indivíduos expostos, mas sem infecção do SNC. Acredita-se que cada fenótipo deva possuir perfis imunológicos distintos, definidos pela expressão de componentes imunológicos do perfil de linfócitos T *helper* (Th) 1 ou Th2 estimulados por antígenos de *T. solium*. Assim, alguns pesquisadores propuseram que o perfil imunoinflamatório com manifestações clínicas combina altamente com resposta do tipo Th1, enquanto que o curso silencioso da doença relaciona-se com o perfil Th2 (CHAVARRÍA et al., 2003).

Na resposta humoral, há predominância de imunoglobulinas G (IgG), aumento menos acentuado de IgE e IgM no soro de pacientes e uma inflamação do tipo celular, crônica, com numerosos linfócitos e plasmócitos (REY, 2001). Num estudo desenvolvido por Odashima et al. (2002), observou-se que há elevação de anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgE e IgA no LCR. Outro fator observado foi a detecção de NC ativa através de ELISA IgG. Também se pôde concluir que as mudanças imunológicas no LCR ocorrem preferencialmente nas formas ativas. Nesses casos as classes de imunoglobulinas eram heterogêneas e relacionadas a múltiplos fatores, como a localização do parasito, a inflamação do LCR e à multiplicidade de sintomas. Porém, não foi possível relacionar o estágio evolucionário da doença com mudanças no perfil das imunoglobulinas.



Desde que infecções helmínticas estão atualmente presentes na maioria dos países em desenvolvimento e também estão presentes nas populações onde HIV-1 é altamente endêmico, a interação entre estas infecções, no mesmo hospedeiro e em nível da população, é de grande importância e tem muitas implicações práticas potenciais. É sugerido que os povos contaminados com helmintos sejam imunologicamente ativados e conseqüentemente mais inclinado a ser contaminados com HIV; além disso, uma vez contaminados com HIV, a infecção progredirá mais rapidamente, e conseqüentemente a erradicação dos helmintos dos indivíduos duplamente contaminados melhorará a progressão do HIV (BORKOW; BENTWICH, 2004). O aumento na freqüência de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) em áreas endêmicas de cisticercose pode aumentar a freqüência desta co-infecção. Apenas poucos casos de NC em paciente HIV foram reportados, e a influência da infecção por este vírus na história natural da NC ainda não está definida. Não há evidências que a imunossupressão pelo HIV facilita esta infecção helmíntica, e que a NC possa exacerbar a progressão do HIV. Tem sido hipotetizado que a eliminação do metacéstódeo pelo sistema imune humoral no estágio inicial da infecção por *T. solium* pode diminuir em paciente com infecção por HIV, levando a um aumento na taxa de cisticercose quando exposto aos ovos deste helminto. Similarmente, casos não usuais de cisticercose severa e disseminada têm sido relatados em pacientes com doenças hematológicas malignas, argumentando que estados de imunodeficiência pode influenciar no curso da NC. Além disso, cisticercos racemosos gigantes, que são incomuns em hospedeiros imunocompetentes, têm sido encontrados mais freqüentemente em paciente com estágios avançados de infecção por HIV (CHIANURA et al., 2006).

### **1.1.3. Neurocisticercose: Diagnóstico e tratamento**

Para estabelecer o diagnóstico de NC é necessária uma interpretação correta dos sinais e sintomas clínicos, dos estudos de neuroimagem e das provas imunodiagnósticas, sempre considerando a epidemiologia relacionada ao paciente (ALARCÓN, 2006). Um conjunto de critérios é utilizado para avaliar objetivamente os dados clínicos, radiológicos, imunológicos e epidemiológicos, estabelecendo, assim, o grau de certeza de diagnóstico da NC em definitiva e provável. Nessa classificação, o diagnóstico definitivo é dado quando é feita a demonstração do escólex do cisticercos, ou quando há lesões sugestivas e teste imunológico positivos, ou ainda a somatória desses à manifestações clínicas sugestivas de NC e dados epidemiológicos. O diagnóstico provável ocorre quando não é possível a realização e união de dados de

neuroimagem, testes imunológicos e dados epidemiológicos (DEL BRUTTO et al., 1996). Uma classificação mais recente proposta por Del Brutto et al. (2001), inclui quatro categorias de critérios estratificados com base em sua força diagnóstica, da seguinte forma: 1) critérios absolutos: demonstração histológica do parasita, lesões císticas com escólex nos testes de imagem, e visualização direto do parasito pela fundoscopia; 2) critérios principais: lesões altamente sugestivas de NC em estudos de neuroimagem, soro positivo no teste de EITB (*enzyme-linked immunoelectrotransfer blot*), desaparecimento de lesões císticas intracranial após a terapia com albendazol ou praziquantel, e definição espontânea de lesões únicas; 3) critérios menores: lesões compatíveis com as de NC em estudos de neuroimagem, manifestações clínicas sugestivas de NC, liquor positivo no teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), e cisticercose fora do SNC; e 4) critérios epidemiológicos: evidência de contato com agregado familiar com teníase, indivíduos que vêm ou vivem em área endêmica de cisticercose, histórico de viagem freqüente às áreas endêmicas. A interpretação destes critérios permite dois graus de certeza diagnóstica: 1) diagnóstico definitivo, nos pacientes que têm um critério absoluto ou naqueles que têm dois critérios principais mais um critério menor e um epidemiológico; e 2) diagnóstico provável, nos pacientes que têm um critério principal mais dois critérios menores, naqueles com um critério principal mais um critério menor e um epidemiológico, e nos pacientes com três critérios menores mais um critério epidemiológico. Devido a maior complexidade da última classificação, muitos pesquisadores adotam a classificação de 1996 para definir o diagnóstico da NC.

A confirmação patológica por biópsia ou autópsia é o único padrão ouro no diagnóstico da NC, porém este tem limitações óbvias. O diagnóstico definitivo pode ser estabelecido quando o escólex é visualizado como um nódulo excêntrico nos métodos diagnóstico de imagem, tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (ALACÓN, 2006; HUSAIN et al., 2008).

A RM é mais sensível na demonstração de metacestódeos intraventriculares e subaracnóides e na identificação do escólex, ao passo que a TC é melhor em mostrar as calcificações (ALARCÓN, 2006). O exame de neuroimagem mais comum em áreas endêmicas é a TC. A última geração de equipamentos de TC possui boa sensibilidade diagnóstica, porém pequenas lesões, especialmente aquelas na fossa posterior, próximas ao osso, ou aquelas dentro de ventrículos ou nas cisternas da base, podem ser perdidas. A RM é mais sensível do que TC, tendo melhor acurácia no reconhecimento de edema perilesional e mudanças degenerativas do parasito, assim como de pequenas lesões e de metacestódeos localizados dentro de ventrículos, tronco cerebral, cerebelo e vesículas racemosas no nível da

fossa posterior e nas cisternas da base (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006), entretanto pode perder pequenas calcificações, possui um custo mais expressivo financeiramente que a TC e está menos disponível nas áreas onde essa doença é endêmica (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005).

Com exceção das lesões nas quais é possível identificar o escólex, a maioria dos outros achados não é específica e pode ser observado em outros tipos de infecção do SNC. Quando não se observa o escólex nos estudos de imagem, devem-se considerar várias condições de diagnóstico diferencial. Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico diferencial mais importante deve ser realizado com os tuberculomas. Outros granulomas como de toxoplasmose, histoplasmose, sarcoidose e neoplasias intracraniais devem também ser incluídos no diagnóstico diferencial (ALARCÓN, 2006). Nestes casos a análise do LCR torna-se de fundamental importância para um diagnóstico correto; os níveis de glicose no LCR devem ser normais em pacientes com NC diferente do que é observado em pacientes com meningite tuberculosa ou micótica (DEL BRUTTO, 2005). A presença de pleocitose e anticorpos específicos coincidem com o estágio degenerativo e intensificação da resposta imunoinflamatória (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). Em pacientes com infarto cerebral a angiografia pode mostrar estenose segmentada ou oclusão das artérias intracraniais de médio calibre (DEL BRUTTO, 2005).

Os métodos de imunodiagnóstico mais utilizados são ELISA e *immunoblot*, que podem ser realizados utilizando amostras de soro ou LCR (COSTA et al., 1982; COSTA, 1986; TSANG; BRAND; BOYER, 1989; DORNY et al., 2003; PARIJA et al., 2004; ALARCÓN, 2006). Estes métodos devem ser utilizados como complementos dos estudos de imagem assim nunca devem, de maneira isolada, confirmar ou excluir o diagnóstico de NC (DEL BRUTTO, 2005). Estes métodos imunológicos possuem a desvantagem de utilizar antígenos brutos ou parcialmente purificados, e assim, com limitações na sua reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, devido reações cruzadas com outras infecções por helmintos (DORNY et al., 2003; FERRER et al., 2007).

A maioria dos laboratórios de diagnóstico de NC utiliza EITB com antígenos glicoprotéicos purificados para detecção de anticorpos (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; PARIJA et al., 2004; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005), que possui a vantagem de ser tão sensível ou mais nas amostras de soro do que LCR (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005). Em países em desenvolvimento, o teste ELISA é preferido pelo fato de maior viabilidade, simplicidade e baixo custo quando comparado ao *immunoblot* (DORNY et al., 2003). O diagnóstico sorológico pelo método de ELISA é utilizado em estudos epidemiológicos

(SILVEIRA-LACERDA et al., 2002; ALARCÓN, 2006; OLIVEIRA et al., 2006), porém há altos índices de falsos positivos e falsos negativos (ALARCÓN, 2006).

O EITB utilizando frações de glicoproteínas (GPs) enriquecidas (12 – 50 kDa) (FERRER et al., 2007) demonstrou 98% de sensibilidade e 100% de especificidade e é utilizado em investigações clínicas (PARIJA et al., 2004; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006) e aceito pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) como o método imunológico de escolha para diagnosticar a doença (FERRER et al., 2007). Porém, em pacientes com um único metacésteo cerebral a sensibilidade do *immunoblot* é de 25 – 30% (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006) e o resultado pode ser negativo na NC calcificada. Um problema adicional do *immunoblot* é que o resultado pode ser positivo em pacientes com teníase ou cisticercose extracerebral (DEL BRUTTO, 2005; ALARCÓN, 2006). Atualmente, as GPs de 10 – 26 kDa do fluido cístico têm sido aceitas para o sorodiagnóstico (SAKO et al., 2006).

O uso de GPs purificadas é limitado devido à tecnologia necessária para o ensaio, alto custo e complexidade do processo de purificação (SILVA et al., 2006). É possível também que a produção de múltiplos anticorpos de diferentes especificidades pelos hospedeiros, em resposta a liberação de antígenos somáticos e excretório/secretório durante as várias fases do desenvolvimento parasitário, esteja relacionada com a dificuldade de detecção de anticorpos por esses ensaios (DORNY et al., 2003). Assim, a baixa reprodutibilidade combinada com a freqüente indisponibilidade de material do parasito tem estimulado o desenvolvimento e uso de antígenos recombinantes (FERRER et al., 2007). O uso da tecnologia do DNA recombinante permite a obtenção de grandes quantidades de proteínas purificadas, permitindo o desenvolvimento de testes mais sensíveis e específicos (SILVA et al., 2006).

Os principais polipeptídeos recombinantes estudados para utilização pelo *immunoblot* e ELISA são os de 10, 7 – 10 e 14kDa (DORNY et al., 2003). Antígenos de baixo peso molecular (8 – 50 kDa) e excretório/secretório (E/S) de metacésteos de *T. solium* têm chamado particular atenção devido à alta especificidade (FERRER et al., 2007).

Entre os antígenos analisados, a proteína de 14 kDa (TS14) é considerada a mais promissora. A TS14 nativa e TS14 recombinante provaram ser útil para o diagnóstico da NC usando EITB e ELISA (SILVA et al., 2006). Ferrer e colaboradores (2007) caracterizaram três moléculas recombinantes potenciais para o diagnóstico de metacésteos de *T. solium* (Ts8B1, Ts8B2 e Ts8B3) como similaridades a antígenos diagnósticos como CyDA, antígeno recombinante de *T. solium* de 10 kDa, e antígenos de 8 kDa da família dos metacésteos de *T. solium*. O antígeno Ts8B2 foi melhor, principalmente em diagnosticar NC ativa. O

antígeno de 20-24 kDa, também conhecido com antígeno de baixa massa molecular já foi utilizado para detecção de anticorpos no soro de adultos e de crianças apresentando bons resultados (MANDAL et al., 2008).

Como a detecção de anticorpos pode indicar exposições e não necessariamente a presença de infecção viável estabelecida, e podem também persistir por longos anos depois de eliminação do parasito, sua detecção pode resultar em falsa positividade e terapia desnecessária. Vários ensaios para detecção de antígenos têm sido desenvolvidos, sendo que a detecção de antígeno, no LCR e soro, indicam infecções recentes, e pode ser uma ferramenta sorológica no monitoramento da terapia (DORNY et al., 2003; PARIJA et al., 2004). A detecção deste tipo de molécula pelo ELISA é realizada através da utilização de anticorpos monoclonais. O uso do Dot ELISA e ELISA padrão para detecção de antígeno no LCR demonstrou 59% e 77% de positividade, respectivamente. E outro método de ELISA baseado no anticorpo monoclonal desenhado para detectar a presença de antígenos E/S mostrou 86% de sensibilidade na detecção destes antígenos no LCR (PARIJA et al., 2004). Husain et al. (2008), utilizaram o teste ELISA para verificar a resposta terapêutica do albendazol na NC através da detecção de IgG e IgM, verificando que a ausência de detecção de ambos os anticorpos denota cura. Um novo método testado para o diagnóstico da NC, é o teste de transformação de linfócito, que parece ser uma ferramenta potencial no diagnóstico da NC (PRASAD et al., 2008).

Como em muitos países é difícil obter suínos infectados com *T. solium* para obtenção de antígenos de metacestódeos deste parasito, muitas pesquisas estão em busca de fontes alternativas de antígenos para o imunodiagnóstico da NC (ARRUDA et al., 2005). A existência de metodologia para obtenção de extrato antigênico de *Taenia crassiceps* e sua reatividade cruzada com *T. solium* fazem desse antígeno uma fonte alternativa para diagnóstico e investigação imunológica da NC (LARRALDE et al., 1989; ESPÍNDOLA et al., 2005). Os antígenos utilizados nestes testes são tanto do fluido cístico ou de preparações do extrato bruto do cisticerco de *T. solium* quanto do parasito relacionado *Taenia crassiceps*, o qual pode ser mantido em roedores de laboratório (BUENO et al., 2001; DORNY et al., 2003). Em outros trabalhos, também houve a confirmação que antígenos do fluido vesicular de *T. crassiceps* podem ser utilizados para detecção de anticorpos específicos no soro de pacientes com NC (ARRUDA et al., 2005; SUZUKI et al., 2007).

Outro antígeno heterólogo que vem sendo estudado como antígeno alternativo para o diagnóstico sorológico da NC é o antígeno obtido de metacestódeos de *T. saginata*,

atualmente confirmados como reais alternativas para o diagnóstico da NC humana (OLIVEIRA et al., 2007).

A utilização de métodos moleculares também é uma realidade. Almeida et al. (2006) descreveram uma reação de PCR (*polymerase chain reaction*) para o diagnóstico da NC, na qual foi obtida especificidade de 100% e sensibilidade de 96,7%, podendo este tipo de ensaio tornar-se uma ferramenta de diagnóstico adicional para a NC.

A respeito do tratamento, apesar de nos últimos 25 anos ter sido atribuído a fármacos cestícidas, geralmente associados à corticóides, em gerar o favorecimento da redução do número ou volume das lesões císticas e granulomatosas, não existe conclusão definitiva da eficácia destes tratamentos. A persistência da controvérsia sobre o tratamento da NC deve-se a complexidade e diversidade das apresentações anátomo-clínicas. Outro fator que dificulta a definição sobre o tratamento é a falta de conhecimento sobre vários aspectos da doença: a evolução natural da enfermidade; a maneira que esta evolução afeta o tratamento e vice-versa; o que acontece ao agregar cestícidas e anti-epiléticos para o manejo das crises epiléticas; quais são os fatores que determinam e indicam a progressão, resolução espontânea ou a formação de calcificações; e como identificar as condições clínicas, nas quais, o tratamento agrega risco de agravar a condição do paciente (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). A decisão do tratamento deve levar em conta múltiplos fatores, incluindo sintomas, localização, número, estágio e tamanho dos cistos, sendo que as opções terapêuticas incluem medicamentos, cirurgia ou apenas espera (KRAFT, 2007)

O tratamento disponível para NC pode ser resumido em seis modalidades: 1) Prevenção e controle sanitário; 2) Fármacos cestícidas ou antihelmínticos com capacidade de causar morte do parasito; 3) Corticóides e outros fármacos imunossupressores que diminuam ou evitem fenômenos inflamatórios relacionados com a evolução do metacestódeo; 4) Fármacos antiepiléticos, que diminuem a frequência ou suprimem as crises epiléticas; 5) Diuréticos para manejar a hipertensão intracraniana; 6) Procedimentos cirúrgicos, para solucionar a hipertensão intracraniana, hidrocefalia e o efeito de massa de algumas lesões. A respeito do tratamento da NC, o único consenso que existe é que se deve definir caso a caso, devido às grandes diferenças clínicas e patológicas com significativas variações de gravidade (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). Os fármacos antiparasitários utilizados no tratamento da NC são albendazol e praziquantel (GARCIA et al., 2002; ENSEÑAT et al., 2007).

Nas formas hemisféricas, parenquimatosas ou córtico-meníngeas, para lesões calcificadas o habitual é não realizar nenhum tratamento (GARCIA et al., 2002; NOGALES-

GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006; ENSEÑAT et al., 2007); nas lesões calcificadas, porém com epilepsia ativa a conduta é tratar a epilepsia independente da NC; com lesões vesiculares e clínica epilética, primeiro trata-se o aspecto clínico e após implanta-se o tratamento de NC com antihelmínticos e corticóides, no entanto se o número de lesões é menor que 5, não há acordo a respeito da conduta, se as lesões são maiores que 5 e menores que 100 com aspecto viável a proposta é tratamento com antihelmínticos e corticóides, mais que 100 lesões não se recomenda tratar devido a potencial magnitude de desenvolver um quadro de encefalite (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). Quando as lesões parenquimatosas não são viáveis ou são degeneradas o consenso é não realizar tratamento antiparasitário com altas doses de esteróides e diuréticos osmóticos (GARCIA et al., 2002).

Apesar da indicação de tratamento cirúrgico nas formas ventriculares (ENSEÑAT et al., 2007), o tratamento deve se orientar também caso a caso. Primeiro deve-se definir a presença do risco de hidrocefalia aguda e, portanto, a pertinência de uma ventriculostomia ou a instalação de uma derivação, segundo a localização do metacestódeo. Para a indicação de ressecção do parasito considera-se o número, localização e estado evolutivo da lesão, complexidade clínica do paciente, capacidade e experiência da equipe cirúrgica. Nas formas ventriculares, também considera o tratamento medicamentoso com cestícidas associados à corticóides e antiepiléticos, quando está presente. O tratamento cestícida nas formas intraventriculares do IV e III ventrículos, somente deve ser realizado quando o risco de hidrocefalia aguda está sobre controle. (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). Em estudo desenvolvido por Husain e colaboradores (2007) há a sugestão de que neurocirurgia endoscópica é a melhor escolha para o tratamento da forma intraventricular, incluindo a do IV ventrículo com hidrocefalia.

Entre as outras formas extraparenquimatosas, a NC localizada nas cisternas da base, o consenso é tratar com fármacos antiparasitários, uma vez que habitualmente não se pode obter uma ressecção cirúrgica completa (ENSEÑAT et al., 2007). E nos metacestódeos subaracnóideos o consenso é o tratamento antiparasitário com esteróides e desvio ventricular se houve hidrocefalia (GARCIA et al., 2002).

Nas formas meníngeas racemosas, apesar da falta de evidência de ensaios clínicos, existe o consenso da combinação de terapias prolongadas com cestícidas e corticóides. Em relação à localização intra ou extramedular a recomendação é o tratamento cirúrgico combinado ou não com cestícidas e corticóides (NOGALES-GAETE; ARRIAGADA; SALINAS, 2006). Porém Ahmad e Sharma (2007) sugeriram que antes da intervenção

cirúrgica o tratamento com albendazol e esteróides deve ser utilizado, podendo assim ser evitada a cirurgia destes casos.

#### 1.1.4. Neurocisticercose: Epidemiologia e Controle

Na maioria dos países de baixa renda, e provavelmente mundialmente, a NC é a principal causa de epilepsia adquirida. Relatos de vários países das Américas do Sul e Central demonstraram existir associação de 30% entre todos os casos de crise convulsiva e NC (GARCIA; DEL BRUTTO, 2005). Na Índia, mais de 50% dos pacientes com desordens convulsivas tem evidência sorológica de cisticercose (HAWK et al., 2005).

A cisticercose suína é uma doença parasitária economicamente importante por afetar um grande número de porcos, inviabilizando a sua carne para o consumo humano e assim acarretando em enormes perdas econômicas. No México, a perda anual devido à cisticercose suína é estimada em 43.310.524 de dólares. A perda anual nos países da África Central e do Oeste africano chega a aproximadamente 25 milhões de euro (PAL; CARPIO; SANDER, 2000; ZOLI et al., 2003).

Além disso, também há gastos em saúde devido à cisticercose humana estimando-se que o paciente permanece hospitalizado por oito dias e perde 19 dias de trabalho, além dos custos com visitas ao médico, exames, medicamentos. Apesar das perdas econômicas, há o estigma social causado pela epilepsia que também deve ser levado em conta na vida do paciente. Uma estimativa mínima de custo de admissão no hospital e perda de dias de trabalho pela NC nos EUA é de \$8,8 milhões anualmente, enquanto que o custo do tratamento no México é de \$89 milhões, e no Brasil de \$85 milhões (PAL; CARPIO; SANDER, 2000).

Apesar de frutas e vegetais que são consumidos crus e que crescem ao chão serem considerados vetores importantes na transmissão de ovos de *Taenia* spp, este provavelmente não é o caso para *T. solium*, pois para aquisição de cisticercose é considerado como principal fator de risco a presença de portadores da forma adulta do parasito (FLISSER et al., 2003), associado com pouca higiene, precárias condições de vida, e acesso de suínos às fezes humanas (PAL; CARPIO; SANDER, 2000). Assim, os fatores que contribuem para a natureza endêmica do complexo teníase/cisticercose são vários, mostrando estreita relação de dependência com os hábitos de higiene pessoal, familiar ou ambiental (AGAPEJEV, 2003; FLISSER; RODRIGHUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Este parasito desapareceu da Europa como resultado de melhoras no saneamento e higiene, porém infecções adquiridas localmente ainda são ocasionalmente relatadas na



Espanha, norte de Portugal, sul da Itália, e Polônia (CARPIO, 2002). Na Espanha, a NC havia desaparecido paralelamente com a melhora nas condições sanitárias, porém a partir da década de 1990 esta enfermidade voltou a surgir devido ao processo migratório de habitantes de áreas endêmicas, principalmente andinos (GIMÉNEZ-ROLDÁN; DÍAZ; ESQUIVEL, 2003).

A cisticercose é classificada como uma doença infecciosa emergente em alguns países desenvolvidos, como Estado Unidos da América (EUA) (CARPIO, 2002), devido à imigração de populações originárias de áreas endêmicas, principalmente para o estado da Califórnia, e também por causa da melhora em neuroimagem levando a um melhor diagnóstico (HAWK et al., 2005). A presença da NC também já foi notificada, no estado do Kansas, ocorrendo principalmente entre indivíduos de origem hispânica (DANIELS; MOORE, 2006), e no Texas, sendo notificada principalmente em indivíduos nascidos no México e na América Central, mas também em pacientes americanos (DEL LA GARZA et al., 2005).

Na Nigéria, a prevalência da cisticercose suína alcança mais de 20,5%. Levando em conta o alto número de portadores de *Taenia ssp* (8,6%) e alta prevalência de epilepsia na Nigéria (37 a cada 1000 habitantes), é antecipado que a cisticercose humana está presente, apesar de não haver nenhum dado publicado. Na República Democrática do Congo 0,1 – 8,1% dos animais estão infectados, e em 1990 30% dos suínos apresentavam cisticercose. Na época colonial, antes de 1960, foi observada alta frequência de epilepsia no Congo com a presença de metacestódeos acima de 3% na população. Na província de Camarões a prevalência da cisticercose limita entre 0,7 e 2,4%. Porém, a soroprevalência na África chega até 38% em algumas regiões (ZOLI et al., 2003).

Na Ásia, enquanto alguns países como Japão e Singapura alcançaram a prosperidade econômica e melhoraram a infra-estrutura, fazendo a doença praticamente desaparecer, e outros países muçumanos chegaram ao mesmo resultado devido às práticas religiosas, há diversos relatos de paciente com cisticercose proveniente de países como Índia, China, Indonésia, Tailândia, Coreia, Taiwan e Nepal, sendo claros indicadores de disseminada prevalência da cisticercose nestes e em outros países da Ásia. A cisticercose é a causa de mais de 50% dos casos de epilepsia na Índia, e também é a principal causa de epilepsia em Bali (Indonésia), Vietnã e possivelmente na China e Nepal. Estudos de soroprevalência indicaram altas taxas de exposição à *T. solium* em diversos países, como Vietnã, China, Coreia e Bali (Indonésia), com valores entre 0,02 – 12,6% de positividade. Costumes locais e hábitos alimentares são os principais fatores na persistência e disseminação da doença nos países asiáticos, por exemplo, muitas comunidades da Indonésia, Vietnã, Nepal, Taiwan e Coreia, consomem carne suína crua durante festivais (RAJSHEKHAR et al., 2003).

Estudos no México revelaram que a prevalência da cisticercose entre os suínos varia 1,0 – 35%, e a sorologia para cisticercose humana revelam taxa de infecção de 4,9 – 12,2% (FLISSER et al., 2003). Em um estudo realizado numa área rural do México, a prevalência suína foi alta (32,8%) e a soroprevalência humana chegou a 43,8%, sendo a frequência da NC de 9,1% determinada por TC (FLEURY et al., 2006).

No Peru, a taxa de infecção encontrada nos animais e nos humano varia de 13 – 61% e 5 – 24%, respectivamente (FLISSER et al., 2003; MONTANO et al., 2005). Em outros países da América do Sul também ocorre a infecção da forma metacestódea de *T. solium*, tanto em suínos como nos humanos, por exemplo, a taxa de infecção na Bolívia chega a 38,9% entre os animais e 22,6% entre os humanos, no Equador 7,5% dos suínos estão infectados e 10,4% dos humanos, e na Guatemala a cisticercose suína varia entre 4 – 14% e a doença humana acomete 10 – 17% da população (FLISSER et al., 2003).

No Brasil, a neurocisticercose é encontrada com elevada frequência nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás, sendo mais comum entre os adultos na terceira e quarta década de idade (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; ANDRADE-FILHO; FIGUEROA; ANDRADE-SOUZA, 2007).

Em 2003, Agapejev realizou uma revisão literária da NC no Brasil, apontando que a soroprevalência da NC, não considerando as comunidades indígenas, nas quais variou de 0,68 – 6,2%, a incidência de cisticercose foi 29,4 – 64%, a união desses valores aponta uma soroprevalência média no Brasil de 7,04%. Dividindo-se em regiões, a soroprevalência foi maior na região centro-oeste com média de 23,14% (5,2 – 41,02%), seguida pela região norte-nordeste com média de 4,06% (1,9 – 6,22%) e a região sul-sudeste com 1,8% (0,68% - 3,2%). E em relação aos estudos clínicos e de necropsia, a incidência de NC variou de 0,03 a 13,4% e de 0,12 a 9%, respectivamente.

Em estudo realizado na cidade de Maringá (Paraná), a frequência da NC em pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional foi de 0,78% (BENEDETI et al., 2007). A prevalência de NC encontrada em outro estudo realizado no estado do Ceará foi de 1,01 caso/100.000hab (FAÇANHA, 2006). Em pesquisa utilizando-se soro de indivíduos da cidade de Catalão (Goiás), verificou soropositividade de 11,3% na busca de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* (OLIVEIRA et al., 2006). Em Ribeirão Preto (São Paulo), diagnosticou-se a NC em 7,5% dos pacientes admitidos na enfermaria de neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Em Uberlândia, Minas Gerais, Costa-Cruz et al. (1995) investigaram a prevalência de cisticercose humana através de 3.937 ocorrências de necropsias, no período de 1971 a 1993,

no serviço de anatomia patológica do Hospital de Clínicas da Fundação de Assistência, Estudo e Pesquisa de Uberlândia. A análise de 2.862 registros de laudos que estavam completos e com idade acima de um ano revelou 39 casos (1,4%) de cisticercose. Destes, 82,1% dos casos eram do Estado de Minas Gerais, 15,4% de Goiás e um caso (2,5%) não foi possível identificação. Dos 39 casos 35 (89,7%) apresentaram comprometimento do SNC.

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

A prevalência de epilepsia de início tardio no Brasil é de 29,5%. Cisticercose relacionada à epilepsia foi encontrada em Florianópolis, SC (19,2% dos casos iniciados depois dos 18 anos), Chapecó, SC (24% dos internados), Recife, PE (8,8%), Mulungu do Morro, BA (15,3% dos pacientes com anticorpos para NC). Foi encontrada em 3,3% das autópsias realizadas em Uberaba, MG e em 1,6% das realizadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (TREVISO-L-BITTENCOURT; SILVA; FIGUEREDO, 1998; LINO-JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 1999; VALENÇA; VALENÇA, 2000; GOMES; VELGA; CORREA, 2002; FAÇANHA, 2006).

A NC tem sido considerada um fator de risco para desenvolvimento de câncer. Em trabalho desenvolvido por Herrera et al. (1999) foi sugerido que a NC é um risco potencial para indução de câncer. Em outro trabalho, 17% de 43 pacientes com glioma tiveram NC quando comparado com 3% de 172 controles (DEL BRUTTO et al., 1997).

Devido à dificuldade de tratamento da NC, busca-se a implantação de medidas de controle. Entretanto, para estratégias de controle, indivíduos com NC não são os alvos essenciais ao passo que estes apenas carregam o parasito. Por outro lado, diagnóstico e cuidados apropriados dos casos de NC devem ser extremamente incentivados para as comunidades entenderem e cooperarem com os programas de controle (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). Pawlowski (2008), propõe uma intervenção para redução da teníase e NC que pode ser empregada fácil e rapidamente através dos serviços médico e veterinário usando uma quimioterapia foco-orientada da teníase.

O uso de tratamento de massa para eliminar platelmintos de portadores humanos utilizando praziquantel ou niclosamida mostrou significativa redução na prevalência (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003; FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006). Modelos de simulações matemáticas demonstraram que ao menos

11 procedimentos de tratamento em massa são necessários para erradicação de *T. solium* em áreas endêmicas (PAWLOWSKI, 2006). O tratamento em massa da população de suínos complementa o tratamento da teníase humana na eliminação de reservatórios de novas infecções (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003).

A melhora da criação de suínos e infra-estrutura sanitária para evitar o acesso dos animais às fezes humanas e a defecação humana indiscriminada em lugares abertos também têm mostrados serem úteis no controle desta parasitose. Altos padrões da inspeção de carne e apropriado descarte de carcaças suínas infectadas também auxiliam na prevenção de suínos infectados e subseqüente infecção humana (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

A educação parece ter efeito em aprimorar o conhecimento da doença e o mecanismo de transmissão, mas pouco efeito na mudança dos comportamentos de risco. Os riscos à saúde relacionados com cisticercose não são percebidos como imediatos ou reais pelos habitantes (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). O fator econômico facilita o sucesso do controle da doença, desde que as pessoas aprendam que a criação de suínos em áreas livres do acesso das fezes humanas deixa os animais livres desta infecção e podem ser vendidos por preços mais altos (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Outros dois principais fatores a serem considerados na implantação de intervenções de controle são: aceitação cultural e custo. Cooperação da comunidade será requerida para alcançar controle sustentável, e fatores econômicos exercerão um papel maior na manutenção de criação doméstica do animal a menos que soluções alternativas sejam criadas (GARCIA; GONZALEZ; GILMAN, 2003). A maioria dos países desenvolvidos controlou o parasito como consequência do processo de desenvolvimento. Assim o controle efetivo ocorreu, quando a manutenção de criação de suínos ficou mais cara do que a obtenção da carne em mercados regulamentados (GONZALEZ et al., 2003).

A vacinação dos hospedeiros intermediários de *T. solium* pode remover a fonte da teníase humana, e indiretamente afetar o aparecimento de novos casos de cisticercose (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006). Para *T. solium* dois antígenos protetores foram definidos, TSOL18 e TSOL45-1A, sendo que os valores de proteção foram 100% e 97%, respectivamente (FLISSER et al., 2004; LIGHTOWLERS, 2006). Porém muito trabalho deve ser feito para tornar a vacinação um método prático e disponível como: garantir uma formulação apropriada, produção de uma vacina estável, melhor eficácia e proteção, proteção de animais neonatos e estabelecer a produção de uma vacina de maneira fácil e com preço acessível (PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005; LIGHTOWLERS, 2006).

Em 1993, a Força Tarefa Internacional para Erradicação de Doença (FTIED) colocou a cisticercose entre as seis doenças de 100, possíveis de serem erradicada. A erradicação da cisticercose foi considerada possível baseada em: 1) o ciclo de vida envolve o humano como o único hospedeiro definitivo, 2) os vermes adultos no humano são a única fonte de infecção para os hospedeiros intermediários, 3) transmissão entre o humano e o suíno pode ser controlada e 4) não existe reservatório silvestre da infecção. Em 2003, a FTIED revisou o status da cisticercose e verificou que o controle ou eliminação de *T. solium* não foi ainda demonstrado. Em setembro de 2003, foi realizada reunião internacional no Centro de Conferência Internacional da Fundação Rockefeller em Belágio, Itália, para avaliar a necessidade de campanhas internacionais para o combate da cisticercose, na qual se chegou ao consenso da necessidade e estabelecimento de um programa global para o combate da cisticercose (FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006).

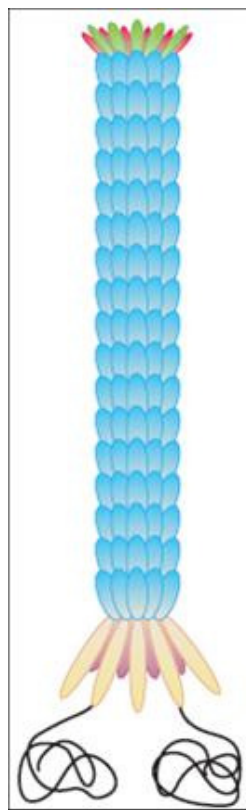
Com o reconhecimento do crescimento global do problema da cisticercose, a Assembléia Mundial de Saúde (AMS) considerou a implantação do controle da NC em 2003. A AMS, que prepara a agenda da Organização Mundial de Saúde (OMS), recomendou que as autoridades devessem ser fortemente encorajadas para instalar inspeção nacional e sistemas de notificação, e adotar métodos mais ativos de prevenção e controle da cisticercose. A OMS está atualmente liderando uma avaliação mundial da cisticercose incluindo o impacto da doença na saúde e na agricultura em países onde já há informação disponível (FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006).

## **1.2. EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS (*PHAGE DISPLAY*) E SELEÇÃO BIOLÓGICA (*BIOPANNING*)**

Desde a sua descrição por Smith (1985), a tecnologia de *phage display* (exposição de biomoléculas em fagos) tem apresentado utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências. Este autor foi o pioneiro a conseguir a expressão da enzima de restrição *Eco RI* com fusão à proteína pIII do capsídeo do fago. Pode-se dizer que as bibliotecas apresentadas no capsídeos de fagos filamentosos, têm emergido como poderosos instrumentos em diversas áreas de pesquisa, desde estudo de estruturas de biomoléculas até obtenção de novos fármacos e vacinas contra diferentes doenças (SMOTHERS; HENIKOFF; CARTER, 2002; AZZAZY; HIGHSMITH JR, 2002). Tang et al. (2004), utilizando uma biblioteca de fagos filamentosos obteve mimetopos à ferritina de *Schistosoma japonicum* candidatos à vacina e que

apresentaram uma significativa proteção contra infecção por este parasito em teste realizado em camundongos.

Bacteriófagos ou simplesmente fagos são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas, usando pilus sexual como receptor, e utilizando a bactéria como uma fábrica para a sua própria replicação (PETTY et al., 2006). As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *Escherichia coli* via pilus F, consistem de fita simples de DNA incluso em uma cápsula protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2000) (Figura 1).



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

A metodologia do *phage display* foi definida como uma metodologia para seleção e identificação de interações ligantes de proteínas (PETTY et al., 2006). O *phage display* é um método de seleção no qual uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada peptídeo encontra-se no genoma viral. Biblioteca de peptídeos sintéticos apresentados em fagos é uma ferramenta

importante para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas de interesse e no desenvolvimento de novas vacinas (AZZAZY, HIGHSMITH, 2002), sendo possível estabelecer a correlação entre cada seqüência de proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, com a qual permite rápida caracterização baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo (ADDA et al., 2002).

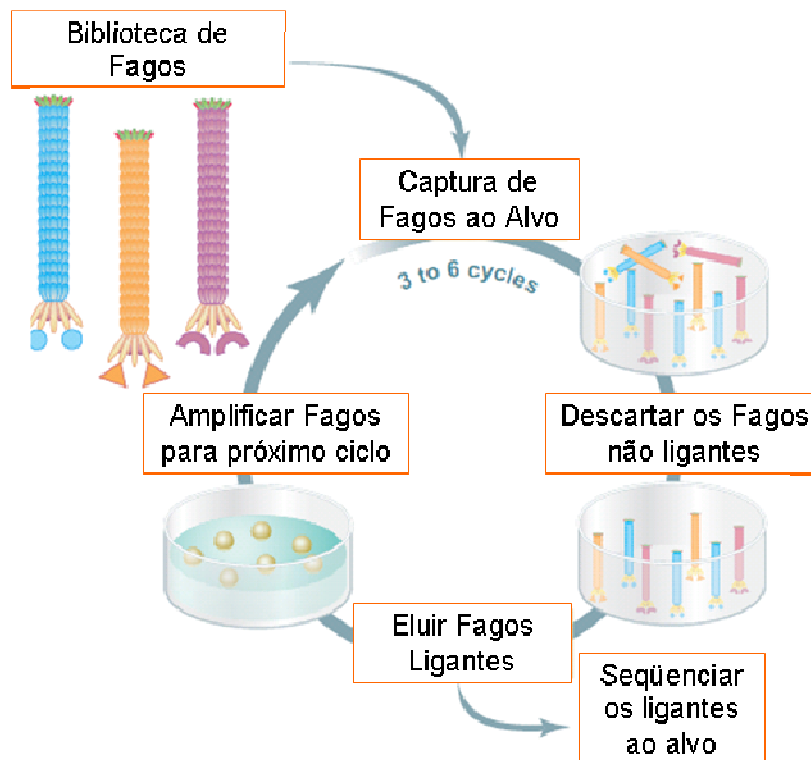
O sistema de *phage display* tem sido usado para seleção e maturação de afinidade de uma gama de proteínas (LEVIN; WEISS, 2006; SIDHU; KOIDE, 2007) e identificação de epítomos (BENTLEY et al., 2000; GERSHONI et al., 2007), além disso vários grupos tem usado esta técnica para selecionar antígenos específicos à tumores (KUROSAWA et al., 2008). Foram expressos na superfície viral: anticorpos, peptídeos, enzimas, receptores de superfície celular, entre outras estruturas (BENHAR, 2001).

Uma grande possibilidade do *phage display* é a conveniência de que tais bibliotecas podem ser selecionadas pelos ligantes alvos-específicos. Desta maneira, bibliotecas com grande diversidade podem ser criadas, amplificadas e selecionadas contra alvos de interesse (SERGEEVA et al., 2006). Essa ampla utilização se deve a algumas vantagens: habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, possibilidade de produzir proteínas solúveis, baixo custo, fácil manuseio e rapidez (SMITH; PETRENKO, 1997). A exposição em fagos apresenta vantagens sobre outras tecnologias pela facilidade de mapear grande número de clones simultaneamente (NOREN; NOREN, 2001), e a detecção somente de bactérias vivas, assim reduzindo o número de falsos positivos que ocorrem no uso de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) (PETTY et al., 2006).

No sistema de *phage display*, as seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos de modo que a proteína codificada seja expressa na superfície do fago como um produto de fusão a uma das proteínas de sua superfície, usualmente com a principal proteína do capsídeo (PVIII) ou a menor proteína do capsídeo (PIII) (AZZAY; HIGHSMITH Jr., 2002; PETTY et al., 2006). Essa união de genótipo (DNA do capsídeo codificando a proteína exposta) e fenótipo (proteína exposta) permitiu um enriquecimento na afinidade de seleções a partir de um número de bibliotecas com milhões ou trilhões de polipeptídeos variantes (LEVIN; WEISS, 2006).

O procedimento de seleção biológica ou *Biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas também se utiliza *beads*, resinas e membranas, então uma população de fagos em solução é incubada com a molécula alvo. Os fagos contendo peptídeos com afinidade pelo alvo são capturados e permanecem ligados, e aqueles não ligados ao alvo

são eliminados por lavagens sucessivas. A subpopulação de fagos específicos é eluída e amplificada. Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos à ciclos posteriores visando o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro repetições desse processo, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, e submetidos à ensaios imunológicos como *western blot* ou ELISA (SERGEEVA et al., 2006) (Figura 2).



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

Uma biblioteca *phage display* de peptídeos randômicos é uma técnica experimental que pode ser utilizada no estudo da interação anticorpo-antígeno (MAYROSE et al., 2007). Vários trabalhos demonstraram a obtenção de peptídeos específicos pela seleção de fagos com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto mimetopos, os que imitam antígenos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos (SERGEEVA et al., 2006; FENG et al., 2009). A identificação de epítomos possui aplicações de importância médica como desenvolvimento de vacinas (YANG



et al., 2005), medicamentos, diagnóstico de doenças e imunointervenção (MAYROSE et al., 2007).

Apesar de *T. solium* causar uma importante doença parasitária em humanos e suínos, incluindo um sério problema neurológico que é a NC, este patógeno não é extensivamente caracterizado no nível molecular, e o diagnóstico desta helmintíase continua sendo um desafio na prática médica (ROBLES et al., 2005). Dessa forma, o uso da técnica *phage display* visa à caracterização molecular de *T. solium* e seu possível uso no aprimoramento do diagnóstico da NC, pois se torna importante o desenvolvimento de melhores metodologias de diagnóstico da NC, principalmente para o auxílio de pacientes residentes de áreas endêmicas como Brasil e o Estado de Minas Gerais, e devido a dificuldade de obter extratos antigênicos purificados que demonstrem altos índices de sensibilidade e especificidade. Em 1999, Manoutcharian e colaboradores conseguiram identificar epítomos de anticorpos presentes no LCR através da construção de biblioteca gênica utilizando a técnica do *phage display*. Estes autores relataram a seleção de peptídeos por *phage display* como uma ferramenta para o desenvolvimento de um teste de imunodiagnóstico mais simples e sensível e no entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese da NC.

Buscou-se também a utilização de antígenos alternativos no método de *phage display*, como o isolamento de antígenos de *T. crassiceps* em biblioteca de cDNA por Robles et al. (2005) e sua utilização na identificação de antígenos para o reconhecimento de anticorpos em amostras clínicas de pacientes com NC.

A metodologia do *phage display* também foi utilizada para análise da homologia de seqüências de peptídeos selecionados de bibliotecas com pacientes com NC e de pacientes sem NC. Dois tipos diferentes de seqüências foram obtidas e distinguidas como “NC-relacionada” e “NC-não relacionada”. Este tipo de análise pode permitir a identificação de doença quando os testes imunológicos são negativos (GAZARIAN et al., 2001). No entanto ainda não foi disponibilizado um teste diagnóstico para NC baseado na técnica de *phage display*.

No futuro, esta metodologia utilizada na geração de antígenos derivados de *T. solium* poderá prover informação útil não só para o diagnóstico de pacientes com NC, mas também o monitoramento do paciente durante o tratamento. A construção de bibliotecas pode ter outras implicações na pesquisa de cisticercose, como identificação de antígenos candidatos à vacina, isolamento de antígenos do parasito circulantes no hospedeiro, ou em estudos da interação parasito-hospedeiro (ROBLES et al., 2005). A viabilidade da utilização de fagos para a vacinação de suínos contra a cisticercose foi testada, e resultados preliminares apontaram para

a capacidade protetora da vacina de fagos contra cisticercose suína (MANOUTCHARIAN et al., 2004; MORALES et al., 2008).

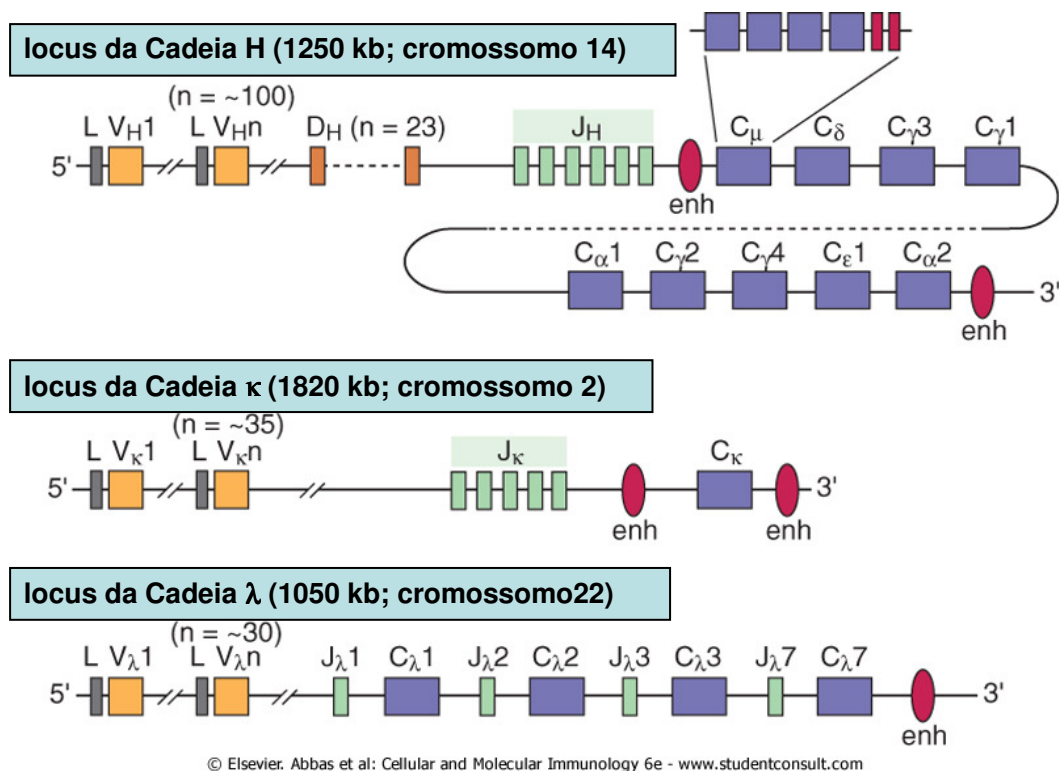
### 1.3. ANTICORPO IGY

As imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos (Ac) são moléculas pertencentes a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, responsáveis pelo reconhecimento de determinantes antigênicos. Todos os anticorpos têm uma estrutura central comum de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. As cadeias leves da maioria das imunoglobulinas dos vertebrados existem sob duas formas distintas, denominadas de cadeias kapa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), constituindo os isótipos presentes em todos os indivíduos. Qualquer um dos tipos de cadeia leve pode se combinar com qualquer um dos tipos de cadeia pesada, mas em uma única molécula de imunoglobulina ambas as cadeias leves e pesadas são do mesmo tipo (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as duas cadeias pesadas são unidas mutuamente. Entretanto quando comparadas entre diferentes imunoglobulinas, as seqüências destas cadeias variam amplamente. Tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves, essa variabilidade é mais pronunciada no domínio N-terminal, sendo denominado de região variável (Fv), abreviada para  $V_H$  e  $V_L$ , respectivamente na cadeia pesada e na cadeia leve, e responsável pela especificidade gênica. Os outros domínios são denominados de região constante ( $C_H$  e  $C_L$ ). Dentro de uma imunoglobulina, as cadeias pesadas e leves são paralelas e este par de domínios forma um sítio de ligação de antígenos. A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída dos domínios constantes e Fab constituída dos domínios  $V_H-C_H$  e  $V_L-C_L$ , responsáveis pela ligação com os antígenos e, portanto denominado sítio combinatorial para o antígeno. As três áreas altamente divergentes dentro das regiões V são chamadas também de regiões hipervariáveis. Como estas seqüências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em seres humanos, a codificação das regiões constantes e variáveis da cadeia leve é feita por dois segmentos separados de DNA. Entre o segmento V e C, e ligada ao segmento V no cromossomo rearranjado, encontra-se uma seção curta extra de DNA conhecida como segmento J (junção). Os genes de cadeia leve sofrem recombinação com os segmentos V e J para dar origem ao gene do domínio  $V_L$ . O segmento gênico  $V_\kappa$  codifica a região V da cadeia

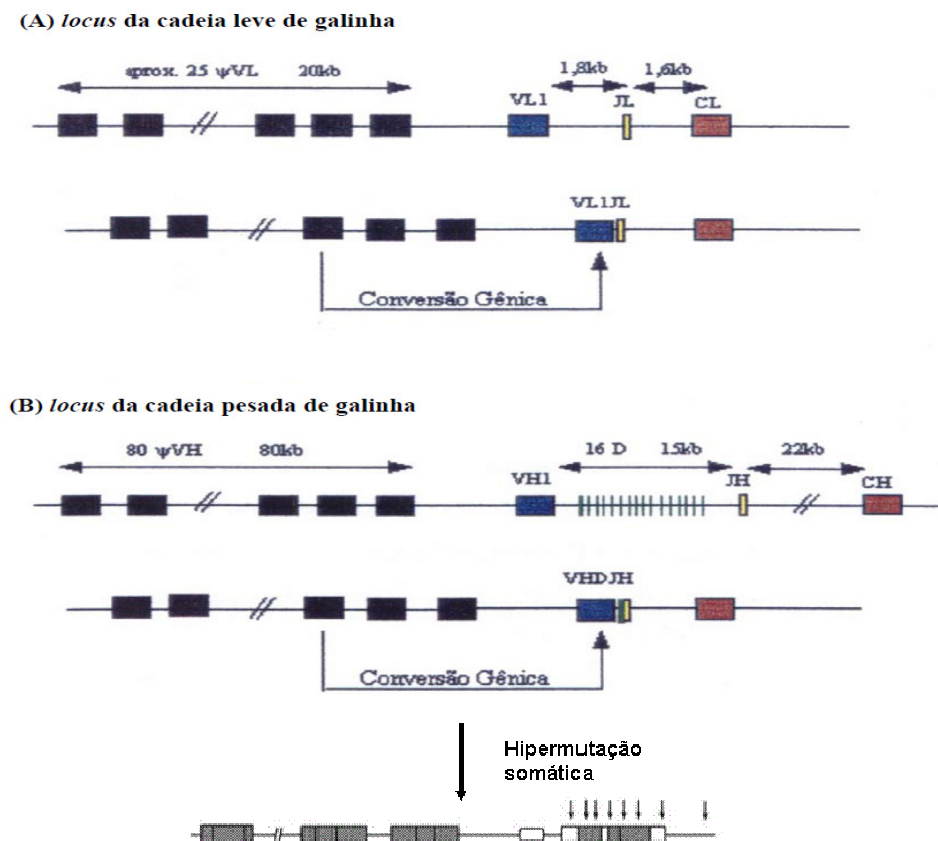
leve do anticorpo, e o segmento gênico  $J\kappa$  codifica o restante da região V. Existe apenas um gene para região C. Durante a diferenciação das cadeias linfóides, existe um rearranjo do DNA de modo que um gene V é unido a um ou cinco genes J. O loco gênico  $\lambda$ , em seres humanos contém um conjunto de genes V, mas cada um dos sete genes C é acompanhado por apenas um gene J. A região variável da cadeia pesada é também codificada por genes do segmento V e J, e por um terceiro segmento gênico, o segmento D, que fornece uma diversidade adicional a esse sistema (Figura 3) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Nesse estágio, dois principais eventos ocorrem: hipermutação somática e recombinação do *switch* de classe. A hipermutação gênica introduz ponto de mutação nos genes rearranjados de Ig, produzindo anticorpos de alta-afinidade (HONJO; KINOSHITA. MURAMATSU, 2002; GONZÁLEZ et al., 2007).



**Figura 3.** Organização dos *loci* da imunoglobulina humana na linhagem germinativa. São mostrados os *loci* das cadeias pesada, e leve ( $\kappa$  e  $\lambda$ ). Os segmentos dos genes são identificados como: L = líder (seqüência sinal); V = variável; D = diversidade; J = junção; C constante; enh = amplificadores. Adaptado de ABBAS; LIGHTMAN; PILLAI, 2008.

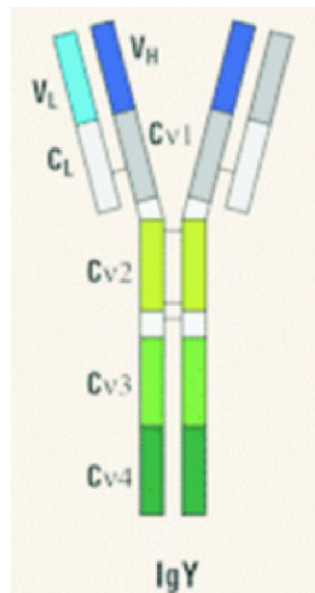
A galinha tem uma única maneira de geração de diversidade nas cadeias leve e pesada da Ig. O *locus* da cadeia L tem somente um gene da região variável ( $V\lambda I$ ) funcional que é

expresso, e um único segmento J. Durante o desenvolvimento da célula B, o gene *V $\lambda$ 1* é diversificado por conversão gênica, usando um conjunto de pseudogenes, genes não codificantes, como doadores de segmentos de DNA. Uma estratégia similar é usada para o repertório da cadeia pesada, na qual único segmento  $V_{H1}$  e J são usados no rearranjo dos genes da cadeia pesada VDJ. A diversidade de Ig nas galinhas ocorre por um processo conhecido como conversão gênica, no qual pseudogenes tomam lugar de seqüências equivalentes dentro de genes rearranjados funcionalmente, e pelo fenômeno de hipermutação somática (MANSIKKA et al., 1990; RATCLIFFE, 2006). Em todos os casos, o rearranjo gênico resulta em justaposição de segmentos de DNA, codificando os genes para as imunoglobulinas (Figura 4).



**Figura 4.** Geração de diversidade de imunoglobulina de galinhas. (A) *locus* da cadeia leve mostrando pseudogenes (quadrados pretos);  $V_L$  = único segmento variável funcional;  $J_L$  = segmento de junção;  $CL$  = segmento constante. (B) *locus* da cadeia pesada mostrando pseudogenes (quadrados pretos);  $V_H$  = único segmento variável funcional; D = exclusivos da cadeia pesada;  $J_H$  = segmento de junção da cadeia pesada;  $C_H$  = segmento constante. Adaptado de RATCLIFFE; JACOBSEN (1994) e ARAKAWA; BUERSTEDDE, 2004 et al. (2004).

O anticorpo IgY é a imunoglobulina predominante no soro de pássaros, répteis e anfíbios, e é transferida para clara do ovo para conferir imunidade passiva aos embriões (ZHANG, 2003). Em 1969, Leslie e Clem descreveram-na pela primeira vez como um homólogo funcional e ancestral evolucionário da IgG e IgE mamíferas, porém estruturalmente diferente (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). IgY é considerada um típico anticorpo de baixo peso molecular, de pássaros, répteis, anfíbios e peixes dipnóicos, tendo duas cadeias leve e duas cadeias pesadas (Figura 5). As cadeias pesadas têm uma região variável e quatro regiões constante, apresentando um peso molecular de 180 kDa (COVA, 2005).



**Figura 5.** Estrutura do anticorpo IgY. V<sub>L</sub> = cadeia leve variável; V<sub>H</sub> = cadeia pesada variável; C<sub>L</sub> = cadeia leve constante; C<sub>H</sub> = cadeia pesada constante. Adaptado de COVA, 2005.

Diferentemente da IgG, IgY não ativa o complemento (CARLANDER et al., 2000), não se liga às proteínas estafilocócica A e estreptocócica G, ao fator reumatóide e ao receptor Fc da superfície celular (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; DAVALOS-PANTOJA et al., 2000; TINI et al., 2002). Adicionalmente, IgY mostra-se resistente aos valores extremos de pH 4-9 (LEE et al., 2002) e não reage com os anticorpos mamíferos IgG e IgM, fato que pode ser usada em muitas maneiras para reduzir reações indesejadas em ensaios usando anticorpos anti-IgG (ZHANG, 2003).

Essas diferenças nas interações moleculares trazem grandes vantagens a aplicação de IgY. Esse anticorpo pode ser usado em uma variedade de métodos em diferentes áreas de pesquisa, diagnósticos, aplicação médica e biotecnologia (CARLANDER et al., 2000;

ERHARD et al., 2000; ZHANG, 2003). IgY gerada por imunização de galinhas com proteínas são atualmente usadas em técnicas de laboratório como por exemplo purificação em coluna de afinidade, análise de *western blot*, imunoeletroforese, imunoprecipitação e teste ELISA (TINI et al., 2002; KRIEF; LETESSON; BILLEN, 2002; COVA, 2005).

Diante das limitações dos testes sorológicos, houve um aumento no interesse da técnica de *phage display* (bibliotecas de peptídeos randômicos expressos na superfície de fagos), desenvolvida nos últimos anos como fonte de identificação de variado número de epítomos e mimetopos, e do *biopanning* para a seleção biológica dos fagos ligantes às moléculas alvos. Apesar de *T. solium* causar uma importante doença parasitária em humanos e suínos, incluindo um sério problema neurológico que é a NC, este patógeno não é extensivamente caracterizado no nível molecular, e o diagnóstico desta helmintíase continua sendo um desafio na prática médica (ROBLES et al., 2005). Em relação a utilização destas técnicas na caracterização molecular de *T. solium* e possível uso no aprimoramento do diagnóstico da NC, os trabalhos ainda poucos, e ainda não foi disponibilizado um teste diagnóstico para NC baseado na técnica de *phage display*. Torna-se importante o desenvolvimento de melhores metodologias de diagnóstico da NC, principalmente para o auxílio de pacientes residentes de áreas endêmicas, que são em sua maioria países em desenvolvimento como Brasil, e o Estado de Minas Gerais, e da dificuldade de obter extratos antigênicos purificados que demonstrem altos índices de sensibilidade e especificidade. Deste modo, a metodologia do *phage display* poderá prover informações úteis não só para o diagnóstico de pacientes com NC, mas também o monitoramento do paciente durante o tratamento, além da identificação de antígenos candidatos à vacina e isolamento de antígenos circulantes no hospedeiro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

- Caracterizar peptídeos específicos da forma metacestódea de *Taenia solium*, por meio de imunização em galinhas, e investigações genômicas para identificação de antígenos candidatos ao diagnóstico da neurocisticercose.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desenvolver a resposta imunológica em galinhas contra as proteínas do extrato total de metacestódeos de *T. solium*.
- Isolar e caracterizar as imunoglobulinas de galinhas anti-proteínas totais do metacestódeo de *T. solium*.
- Selecionar peptídeos mimético com afinidades ligantes específicas à IgY anti-proteínas totais do metacestódeo de *T. solium* por *phage display*, visando a identificação de epítomos específicos para o diagnóstico da neurocisticercose.
- Confirmar a imunorreatividade dos fagos recombinantes selecionados através do método imunoenzimático ELISA.
- Caracterizar os fagos selecionados por seqüenciamento e bioinformática, determinando os antígenos potenciais no diagnóstico da NC.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos (CEP) (234/2007) e pelo Comissão de Ética em Pesquisa na Utilização de Animais (CEUA) (001/2008) da Universidade Federal de Uberlândia.

Certificado de Biossegurança pela CTNBio:CQB 162/02 (Processo 012000.008091/2002-60), publicado no Diário Oficial da União, número 5, Seção 3, de 15/03/2002.

#### 3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL DE METACESTÓDEOS DE *TAENIA SOLIUM*

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. solium* para o preparo do extrato total, de acordo com Costa (1986), com algumas modificações. Os metacestódeos foram ressuspensos em 2,5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col<sup>®</sup>, USA), a 4° C por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica São Paulo, Brasil) a 40 kHz por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonização com 2,5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a 4° C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12.400 x g (Du Pont Sorvall<sup>®</sup> 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 Chen. Co, St. Louis - MO, USA), posteriormente o antígeno foi dividido em alíquotas de 1,0 mL e de 250 µL em microtubos de poliestireno “Eppendorf”.

#### 3.3. IMUNIZAÇÃO DE AVES

Foram imunizados quatro animais da raça *White-Leghorn* de três semanas de idade, cedidos pela granja Planalto de Uberlândia-MG. O esquema de imunização foi de acordo com BARBAS et al. (2001), com algumas modificações.

Três aplicações intramusculares do extrato total de metacestódeos de *T. solium* emulsificado em adjuvante foram realizadas, sendo que na primeira imunização a quantidade de proteína foi de 200 µg, e as demais de 100 µg, com intervalos de 15 dias entre cada uma



das imunizações. Na primeira dose foi usado adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e nas doses subseqüentes o adjuvante incompleto de Freund (Sigma), sendo que em ambas correspondiam a 50% do volume total da solução. Além do adjuvante, também foi acrescido solução de tampão fosfato (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, pH 7.4) para tamponar a solução. Foram imunizadas duas galinhas e duas foram mantidas como controle, imunizadas somente com adjuvante e PBS. No sétimo dia pós-imunização (dpi) foi feita coleta de sangue dos animais, e o título de anticorpos específicos foi monitorado por testes ELISA. Após 14 dpi foi realizada uma nova imunização até a obtenção do título ideal de anticorpos. Após 3 meses coletou-se o sangue total dos animais.

Para tanto, placa de microtitulação de poliestireno foi sensibilizada com 50 µL de extrato salino de *T. solium* em concentração ideal de 1 µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida, os poços foram bloqueados com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e adicionado ainda 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM), durante 30 min a 37° C. Após três ciclos de 5 min de lavagem com PBS-T, as amostras de soro das galinhas pré e pós imunizações diluídas seriadamente (1:2) de 1:500 até 1:200.000 em PBS-TM foram incubadas por 45 minutos a 37°C, sendo que as amostras dos animais pré imunização e dos animais controle constituíram os controles negativos. Após novas lavagens com PBS-T, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgY marcado com peroxidase na diluição de 1:5000 em PBS-TM (50 µL/poço) para a reação com soro. Repetiu-se o processo de lavagem, e foi feita a adição de 50 µL/poço da solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para revelação. Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (Tp Reader, Thermoplate, China).

O *cut-off* foi calculado pela soma das médias de densidade óptica (DO) do soro pré-imunização e dos animais controles mais 2 vezes o desvio padrão, e o índice ELISA pelo valor de DO obtido em cada diluição dividido pelo *cut-off*. Após a constatação do título apropriado, os animais foram sacrificados por punção cardíaca. O sangue foi armazenado à 37° C por 1 hora e, logo após, à 4 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 3000 x g por 10min para obtenção do soro a ser purificado.

### 3.3.1. Purificação dos anticorpos

A purificação de IgY foi realizada com o uso da coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5 mL (Amersham Biosciences, USA). Foi utilizado um sistema completo de cromatografia líquida modelo *Akta Purifier* (Amersham Bioscience).

A bomba peristáltica foi preenchida com tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, pH 7.5), e então conectada à coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes (25 mL) de cada tampão: 1) ligação ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M, pH 7.5); 2) eluição; e 3) limpeza ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, 30% volume/volume de isopropanol, pH 7,5). Em seguida a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação, e foi aplicada amostra (6 mL de soro). A coluna foi lavada com 10 volumes da mesma (50 mL) de tampão de ligação. As IgY foram então eluídas com 10 volumes da coluna de tampão de eluição, sendo coletadas amostras de 1 mL. A coluna foi regenerada com 8 volumes (40 mL) de tampão de limpeza, e reequilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. À medida que as amostras foram filtradas na coluna de purificação, as leituras ópticas das alíquotas (OD 280nm) eram obtidas.

A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma). O anticorpo foi posteriormente dividido em alíquotas de 1,0 mL em microtubos de poliestireno “Eppendorf”.

A visualização das amostras de IgY purificadas foi realizada por SDS PAGE 12%, como descrito por Laemmli (1970), através de coloração do gel de poli(acrilamida) pela prata.

### 3.3.2. ELISA para confirmar a especificidade da IgY

Após a obtenção do anticorpo purificado foi necessário confirmar a especificidade das IgYs em relação ao metacestódeo de *T. solium* e tal constatação foi realizada através do ensaio de ELISA de maneira semelhante ao realizado anteriormente.

A placa de microtitulação de poliestireno foi sensibilizada com 50  $\mu\text{L}$  de extrato salino na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M pH 9,6) e incubada por 18 horas a 4 °C. Em seguida, os poços foram bloqueados com PBS-TM durante 30 min a 37° C. Após três ciclos de cinco minutos de lavagem com PBS-T, as amostras de IgY purificadas diluídas 1:1.000 em PBS-TM (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) foram incubadas por 45 min a 37° C, sendo que as amostras pré imunização e dos animais controles constituíram os controles negativos. Após novas lavagens com PBS-T, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgY marcado com peroxidase na diluição de 1:5000 (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) para a reação com soro. Após

novos processos de lavagem a reação foi revelada pela adição de 50  $\mu\text{L}$ /poço de OPD acrescido de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (Tp Reader, Thermoplate). O *cut-off* foi calculado pela soma das médias de densidade óptica (DO) das amostras pré-imunização e dos animais controles mais 2 vezes o desvio padrão, e o índice ELISA pelo valor de DO obtido em cada diluição dividido pelo *cut-off*.

### **3.4. PHAGE DISPLAY – EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS - E BIOPANNING - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS**

Para a seleção dos peptídeos (expressos na proteína III do capsídeo de fagos filamentosos), reativos com os anticorpos acima descritos, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos (Ph.D. 12 mer, New England Biolabs, USA). As bibliotecas expressas em fagos M13 filamentosos (New England Biolabs) são compostas por peptídeos randômicos seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly em fusão à região N - terminal da proteína capsídica menor (Proteína III). A biblioteca Ph.D.12 mer apresenta 12 peptídeos aleatórios e contém peptídeos linearizados pela delimitação por cisteínas nas extremidades peptídicas. Esta biblioteca consiste de aproximadamente  $2,8 \times 10^{11}$  clones independentes, os quais representam  $1,9 \times 10^9$  possíveis combinações de resíduos de aminoácidos. Todas as cinco cópias da Proteína III capsídica dos fagos, contêm, peptídeos randômicos aminoterminais (Noren; Noren, 2001).

A biblioteca de fagos foi incubada com a fração eluída de imunoglobulinas IgY anti-proteínas totais do metacésteo de *T. solium*. Foi adsorvido no poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp, NUNC, USA) 150  $\mu\text{L}$  de IgY purificada em coluna específica para IgY (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 8,6) e incubada overnight a 4° C. A placa foi bloqueada com 150  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 8,6, 5 mg/mL BSA) por 1h sob agitação a 4° C, e lavada seis vezes com solução tamponada de tris (TBS, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) acrescido 0,1% Tween 20 (TBS-T1%). Foi realizada uma seleção negativa, na qual os fagos foram colocados inicialmente em poço contendo IgY purificada do soro pré imune, os fagos não ligantes foram passados para o poço adsorvido com IgY do soro do animal controle imunizado com PBS, durante 1h sob agitação a temperatura ambiente em cada poço. Posteriormente os fagos não ligantes durante a seleção negativa foram incubados no poço com IgY purificada dos soros dos animais imunizados, e

após 1h os fagos ligantes foram eluídos com 200 µg de extrato total de metacestódeos de *T. solium*.

Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi titulada e o restante foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento (OD<sub>600</sub>=0,3), contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura a 37° C, antes do procedimento de precipitação dos fagos e posterior titulação. A cultura foi transferida para um tubo Oakridge (Hitachi, 50 mL) e centrifugada (10 min, 10.000 rpm). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para outro tubo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M, água), e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4° C.

No dia seguinte, a precipitação foi centrifugada 15 minutos a 10.000 rpm à 4° C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos, 10.000 rpm à 4° C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada (10 min, 14.000 rpm, 4° C). O sobrenadante foi descartado, e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuscitado em 200 µL de TBS, obtendo-se então o eluato amplificado, pronto para a titulação.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e assim subsequentemente, por um total de três ciclos, sendo que no último ciclo a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens e foram sensibilizados dois poços com soros dos animais pré-imunização e dos animais controles.

Para todas as titulações foram utilizados 1 µL dos fagos, diluídos em 9 µL de meio de cultura LB. As diluições ( $10^1$  a  $10^7$ ) foram incubadas com 200 µL de *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O/litro). O vetor de fago utilizado contém o gene lacZ, permitindo que clones reativos fossem selecionados pela coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas). O resultado se expressa por P.F.U. (unidades formadoras de placa).

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

### 3.5. SEQÜENCIAMENTO DE DNA DOS BACTERIÓFAGOS

Para obtenção de DNA dos bacteriófagos filamentosos de fita simples, cada colônia isolada obtida do 3º ciclo não amplificada foi dispensada separadamente em microtubos “eppendorfs” contendo 1,0 mL de meio de cultura com *E. coli* em fase de crescimento inicial e 100 µl de antibiótico tetraciclina. Os microtubos foram incubados, overnight à 37° C sob agitação. Seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm por 30 segundos a 4° C, para a retirada do sobrenadante da cultura. O sobrenadante foi transferido outro microtubo e recentrifugado para limpar melhor o sobrenadante, e ao precipitado foi adicionado glicerol para posterior amplificação. Passou-se o sobrenadante para outro tubo e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl, e incubando por 10 min à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm a 4° C, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado suspenso em 100 µl de tampão iodeto para dissolução do pellet e então adicionado 250 µl de etanol 100% e deixado em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação por 10 min a 14.000 rpm a 4° C. O pellet foi lavado com etanol 70% e depois centrifugado (14.000 rpm/10 min/4° C). O sobrenadante foi descartado, os tubos foram deixados secar em papel filtro, e por fim ressuspensos em 20 µl de H<sub>2</sub>O mili-Q. Para confirmar a extração do DNA foi feito gel de agarose 1,5%.

O seqüenciamento foi realizado utilizando o kit *DYEnamic™ ET dye termination* (GE Healthcare, USA) e seqüenciador automático *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o *primer* M13 (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3', Invitrogen, USA) que amplifica a região do DNA do fago correspondente aos insertos dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados na proteína PIII. Foram utilizados em cada poço da placa para reação de seqüenciamento 500 ng de DNA molde (DNA de cada fago por poço), 5 pmol do *primer* e *Premix* (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit, Amersham Biosciences). Para a realização da reação de 35 ciclos foi utilizado um termociclador de placas (MasterCycler, Eppendorf, Brasil) nas seguintes condições: desnaturação (a 95° C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58° C por 15 segundos) e extensão (a 60° C por um minuto).

A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15). Logo após esta pré-análise, as seqüências dos vetores foram selecionadas, e somente os insertos com resíduos perfeitos foram traduzidos.

### 3.6. AMOSTRAS DE SORO

Foram obtidas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico confirmado de NC por meio de história clínica, dados epidemiológicos do paciente, TC e positividade no ELISA para cisticercose, constituindo o Grupo 1. Para tanto, todos os pacientes selecionados tiveram analisados os prontuários médicos, e somente aqueles com laudo técnico de exame de neuroimagem foram incluídos no trabalho, sendo este dado utilizado na classificação de cada paciente. Deste grupo, dezoito (45%) foram classificados com NC ativa e vinte e dois (55%) com NC inativa. No total, vinte e dois (55%) pacientes eram do sexo feminino e dezoito (45%) eram do sexo masculino, sendo que no grupo com NC ativa os pacientes do sexo feminino correspondiam à 39% (7/18) e os do sexo masculino à 61% (11/18), no grupo com NC inativa 68% (15/22) dos pacientes eram do sexo feminino e 32% (7/22) do sexo masculino. A média das idades foi de 41 anos (variando de 14 a 82 anos) e a mediana de 42 anos. Dentre os pacientes com NC ativa a média foi de 37 anos (variando de 14 à 59) e mediana de 40 anos. Para os pacientes com NC inativa a média das idades foi 45 (indo de 26 à 82) com mediana de 43 anos.

Para verificar a reatividade cruzada em métodos sorológicos, foram obtidas 40 amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2), entre elas: Ancilostomídeos (5), *Ascaris lumbricoides* (5), hidatidose por *Echinococcus granulosus* (3), *Enterobius vermicularis* (5), *Hymenolepis nana* (4), *Schistosoma mansoni* (3), *Strongyloides stercoralis* (5), *Taenia* sp. (5) e *Trichuris trichiura* (5). Embora, esses pacientes fossem provenientes de área endêmica para cisticercose, eles não apresentavam história prévia de contato com portadores de *T. solium*, teníase ou cisticercose. Os dados referentes ao sexo e idade não foram acessíveis em 4 (10%) destes pacientes, que constituíram de 3 amostras de pacientes infectados por *E. granulosus* (amostras provenientes do Laboratório Central de Porto Alegre) e 1 amostra de pacientes infectados por *E. vermicularis* (amostra proveniente do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia). Entre os pacientes, em que foram acessíveis os dados quanto ao sexo e idade, 58% (21/36) pertenciam ao sexo feminino e 42%

(15/36) ao sexo masculino. A média das idades foi de 27 anos (variando de 2 a 70 anos) e a mediana foi de 25 anos.

O Grupo 3 constitui de 30 amostras de soro de indivíduos saudáveis, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelos métodos de Baermann (1917) modificado por Moraes (1948) e HPJ (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934) foram negativos para parasitos intestinais, negaram história anterior de teníase-cisticercose e foram negativos em exames sorológicos para cisticercose. Vinte pacientes (67%) pertenciam ao sexo feminino e dez (33%) ao sexo masculino. Nesses indivíduos a média das idades foi de 26 anos (variando de 5 a 60 anos) e a mediana foi de 24 anos.

### **3.7. TESTE ELISA DOS PEPTÍDEOS CONTRA SORO HUMANO ESPECÍFICO**

Para realização do teste ELISA com os clones selecionados, primeiramente as placas foram sensibilizadas com  $1 \times 10^{10}$  fagos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, durante 18h a 4°C. Em seguida, as placas foram manualmente lavadas com auxílio de micropipeta automática por seis vezes com PBS-T 0,05% e adicionado 300 µl de solução de bloqueio PBS-TM, durante 1h a 37°C. Após novas lavadas, foi colocado na placa 100 µl de soro, dos pacientes do grupo 1, 2 e 3, diluído 1:200 em PBS-TM e incubados durante 1h a 37°C. As placas foram novamente lavadas, e 100 µl do conjugado anti-IgG marcado com peroxidase diluído 1:2000 em PBS-TM foi adicionado durante 1h a 37°C. Após lavar as placas, a reação foi revelada pela adição de 100 µl de OPD adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 10 min. A reação foi interrompida utilizando 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura da densidade óptica (DO) de cada fago foi realizada em leitor de ELISA (Tp Reader, Thermoplate) no comprimento de onda de 492 nm.

Todos os clones foram testados em duplicata e para controle negativo foi testada a reação do soro contra o fago *Helper*. O *cut-off* foi calculado da seguinte forma: [(média das DOs do soro com fago *Helper*) + 3 x Desvio Padrão], em seguida foi determinado o índice de Reatividade (IR) de cada fago utilizando a seguinte equação: (média de DO de cada clone) / *cut-off*. Foram considerados positivos aqueles soros com RI maior do que 1.

### **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Diferenças entre a sensibilidade no diagnóstico da NC, e a frequência dos aminoácidos de cada fagotopo foram calculadas pelo teste Binomial (*Biostat 5.0*). A análise entre os grupos 1, 2 e 3 de cada clone foi feita com o teste T, ou seu teste não paramétrico correspondente

Mann-Whitney, caso os dados não apresentassem distribuição gaussiana (*GraphPad Prism* 4.0). Os valores de probabilidade (P) menores do que 0,05 foram considerados como significantes. Valores de sensibilidade, especificidade e eficiência diagnóstica (ED) (BARBIERI et al., 1998) foram calculados para cada clone.

### 3.9. ANÁLISE DE DADOS POR BIOINFORMÁTICA

As análises de DNA geradas pelo seqüenciamento foram analisadas utilizando programas de bioinformática disponíveis na rede mundial de computadores. A seqüência de aminoácidos foi traduzida através do programa DNA2PRO12 (<https://relic.bio.anl.gov/dna2pro.aspx>). A população dos peptídeos foi caracterizada quanto à frequência de aminoácidos pelo programa AAFREQ (<https://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx>), e para calcular se havia diferença significativa entre a frequência esperada e a frequência observada de cada aminoácido utilizou-se o Teste Binomial entre duas proporções (BioEstat 5.0). Os motivos protéicos dos peptídeos foram gerados pelo MOTIF2 (<https://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>), considerando-se um motivo conservado para peptídeos alinhados quando estes são longos o suficiente para gerar uma estrutura secundária parcial. Para identificação de demais pareamentos dos peptídeos selecionados foi utilizado o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Para calcular a diversidade e a derivação padrão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos utilizou-se o programa DIVAA (<https://relic.bio.anl.gov/divaa.aspx>).

Foram feitas procuras no “GENEBANK” através do programa *Protein BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool – [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) para similaridade dos peptídeos isolados com proteínas de *Taenia* sp. já depositadas.

Para encontrar um ponto máximo de similaridade entre toda a população de peptídeo selecionada e uma proteína de interesse encontrada no BLASTp por similaridade, utilizou-se o programa MATCH (<https://relic.bio.anl.gov/match.aspx>)

### 3.10. NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

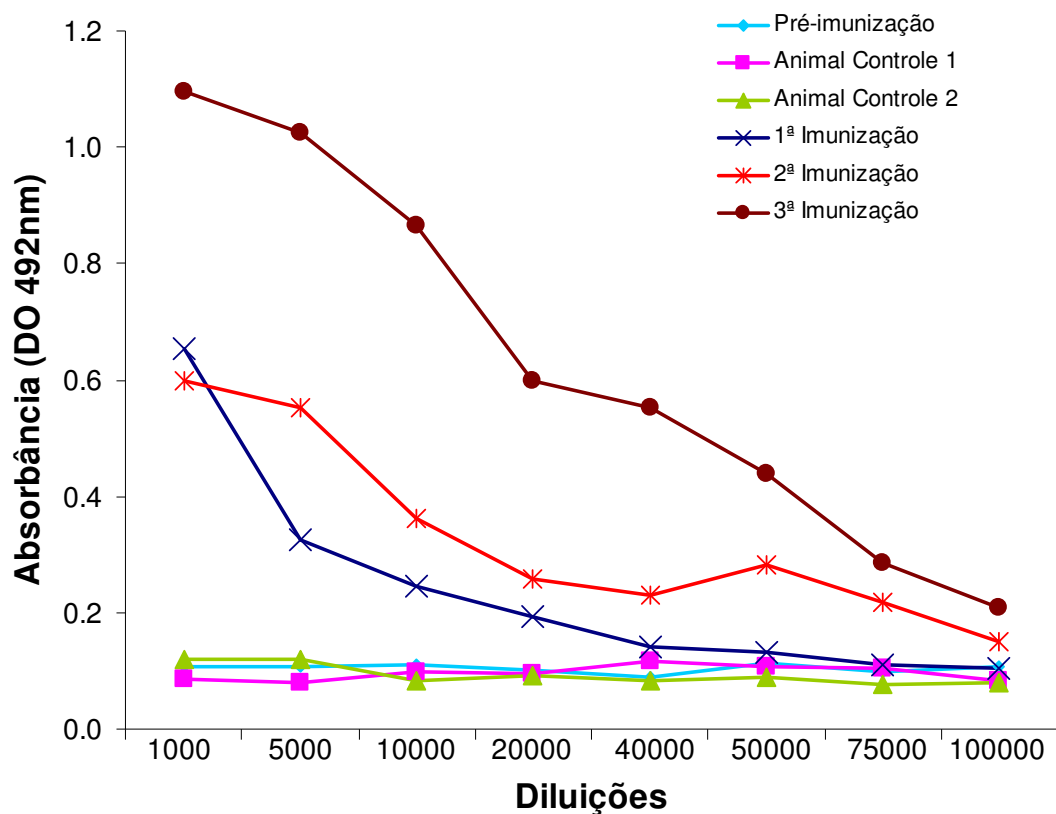
Todo o procedimento de colheita, manuseio do material biológico e dos reagentes, e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Chaves-Borges; Mineo (1997).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. IMUNIZAÇÃO DE AVES

Inicialmente, na seleção biológica por imunoafinidade, foi necessário a geração de anticorpos policlonais anti-proteínas totais de metacestódeos de *T. solium* objetivando não só a seleção dos peptídeos randômicos expressos nas bibliotecas de *Phage Display*, mas principalmente descobrir novos antígenos ocultos que pudessem ser reconhecidos pelo sistema imune da galinha, um animal não hospedeiro deste parasito. Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos ao extrato protéico em contraste com os animais controle negativo. O títulos obtido no “pool” dos soros dos animais imunizados foi de 1:100.000 (Figura 6).

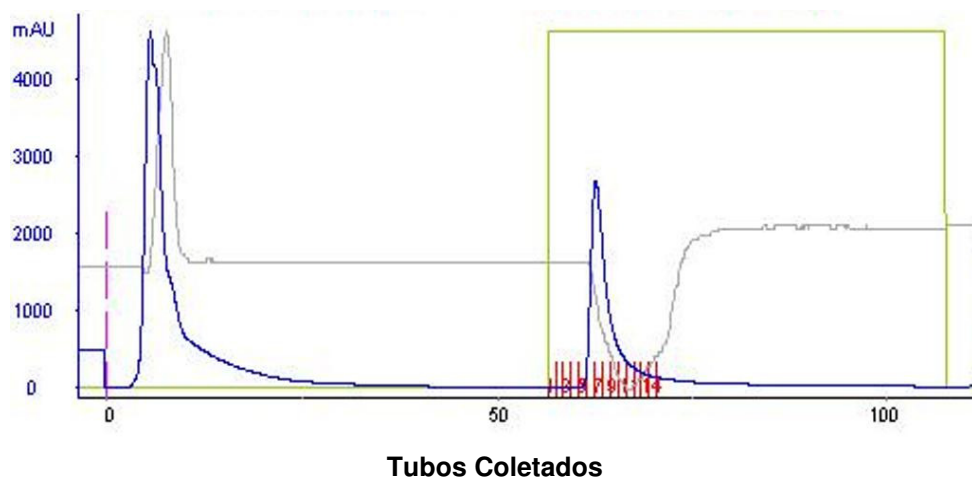


**Figura 6.** Resultados da titulação dos anticorpos IgY dos soros das galinhas imunizadas (n = 4). O gráfico representa a disposição dos valores do ELISA (OD 492 nm) em função da diluição dos soros testados.

## 4.2. PHAGE DISPLAY – EXPOSIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM FAGOS - E BIOPANNING - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS

### 4.2.1. Purificação dos anticorpos

A purificação dos anticorpos foi eficiente, pois houve uma limpeza das amostras na coluna de purificação após a incubação do soro, mostrado pelo decréscimo da densidade ótica (OD) nas frações coletadas (Figura 7).



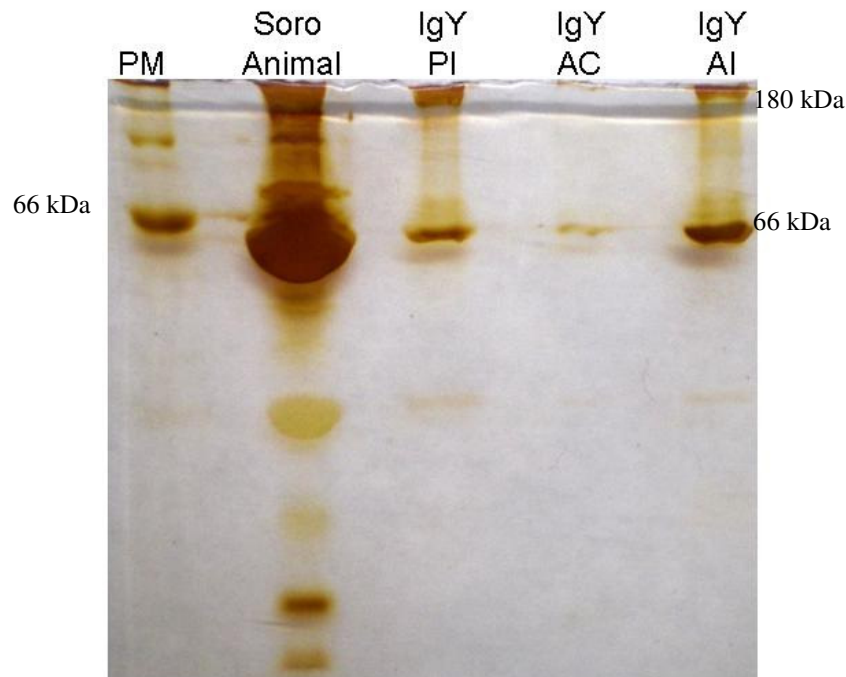
**Figura 7.** Diagrama de purificação de IgY utilizando cromatografia líquida (HPLC). Primeiro pico corresponde a entrada da amostra biológica (soro) e lavagem dos componentes inespecíficos à coluna *HiTrap IgY Purification HP* (Amersham Biosciences); segundo pico corresponde à eluição da IgY purificada.

As amostras que apresentaram DOs semelhantes foram reunidas em um único tubo, e os rendimentos protéicos das frações (Lowry et al., 1951), podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dosagem protéica dos anticorpos IgY purificados.

Soro das Galinhas (n)	Quantificação
“pool” pré-imunização (n = 4)	968 µg/ml
“pool” animais controles (n = 2)	3.690 µg/ml
“pool” animais imunizados (n = 2)	4.910 µg/ml

As frações coletadas foram analisadas quanto ao perfil eletroforético (SDS PAGE 12%) demonstrando estar livre de impurezas que pudessem prejudicar o procedimento de seleção de peptídeos recombinantes, como mostra a Figura 8. As bandas de IgY obtidas contém as seguintes massas moleculares: ~ 180 kDa (IgY inteira); ~ 66kDa (cadeia pesada), a cadeia leve de ~ 25 kDa não foi detectada.



**Figura 8.** Perfil eletroforético da IgY purificada a partir do soro obtido das aves durante a imunização com antígeno salino total de metacestódeos de *T. solium*. Da esquerda para direita apresentam-se: PM = Padrão de peso molecular; Soro Animal = soro total obtido da sangria dos animais pós imunização; IgY PI = IgY purificada do soro dos animais pré-imunização; IgY AC = IgY purificada do soro do animal controle; IgY AI = IgY purificada do soro dos animais imunizados.

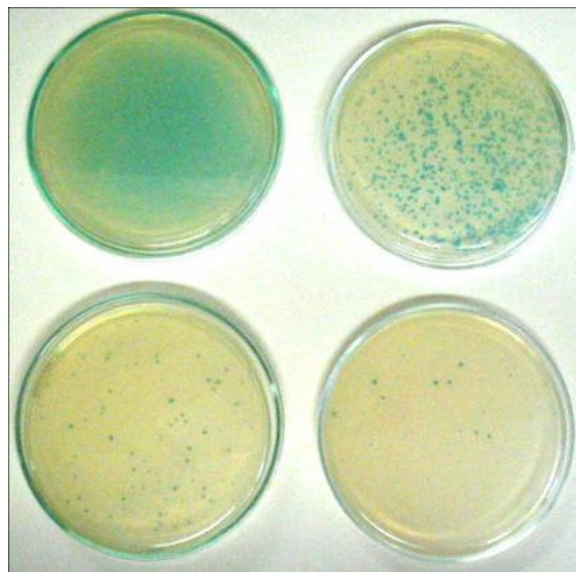
#### 4.2.2. ELISA para confirmar a especificidade da IgY

Foram testados as IgYs purificadas dos soros das galinhas pré-imunização, das imunizadas com proteínas totais de metacestódeos de *T. solium* e das galinhas controles. Foi verificado que o anticorpo obtido na imunização foi específico ao antígeno utilizado. Os valores de IR foram respectivamente, 0,6914, 0,7407 e 15,1358, para a IgY dos animais pré-imunização, controles e animais imunizados.

### 4.3. BIOPANNING – SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS

Para a seleção dos peptídeos complementares à imunoglobulinas IgY anti-proteínas totais do metacestódeo de *T. solium*, utilizou-se a biblioteca Ph.D.12 mer que apresenta peptídeos de 12 aminoácidos aleatórios ligados à PIII do fago M13. Durante a seleção, a biblioteca de fagos foi incubada com as IgY purificadas e os fagos ligantes foram eluídos com extrato total de metacestódeos de *T. solium*. Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi titulada e o restante foi utilizado para reamplificação, realizadas em cultura de *E. coli* (ER2537).

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos. As colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER27308 (Barbas, 2001), como mostrado na Figura 9. A presença de colônias brancas indicaria a contaminação do experimento com fagos de origem selvagem.



**Figura 9.** Placas resultantes da titulação. As colônias azuis representam a infecção de bactérias *E.coli* (ER2738) com fagos M13 carregando o gene *lacZ* da  $\beta$ -galactosidase.

Contava-se o rendimento das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias. Os valores das titulações mostraram enriquecimento dos fagos específicos, que ficavam retidos na placa, durante os processos de seleção (Tabela 2).

**Tabela 2:** Títulos de partículas de fagos (*pfu*: unidades formadoras de placas) obtidos nos três ciclos de seleção.

Ciclo	Fagos adsorvidos	Eluato não amplificado
Primeiro	$4 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^6$
Segundo	$4 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^4$
Terceiro	$4 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^5$

#### 4.4. SEQÜENCIAMENTO DE DNA DOS BACTERIÓFAGOS

A análise eletroforética do gel de agarose 1,5% do DNA extraído dos fagos selecionados mostrou a ausência de degradação ou de contaminantes, tais como RNA bacteriano (Figura 10).



**Figura 10.** Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos clones obtidos no processo de seleção. Poços 1 – 7: amostras de DNA dos fagos selecionados escolhidas aleatoriamente; M - marcador de peso molecular do fago M13, contendo 400ng.

As seqüências de DNA obtidas foram analisadas pelo programa Sequence Analyser (MegaBace, *Amersham Biosciences*). A tradução destas seqüências de DNA em aminoácidos foi realizada pelo programa DNA2PRO12 (RELIC Softwares), específico para bibliotecas de 12 peptídeos da “New England Biolabs”. Dos 46 clones selecionados, 30 apresentaram seqüências válidas. Dessas 30 seqüências, 26 foram diferentes entre si, sendo que as demais apresentavam seqüências repetidas. A Tabela 3 apresenta diversos parâmetros para a indicação do sucesso de seleção de cada peptídeo, conforme RODI; SOARES; MAKOWSKI *et al.* (2002). Os seguintes parâmetros são mostrados: freqüência dos peptídeos expressos nos fagos selecionados; a amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada (FE) dos peptídeos na biblioteca original; o grau de informação de cada peptídeo foi calculado utilizando o log neperiano da probabilidade de ocorrência ao acaso do fago na biblioteca, sendo que quanto maior o grau de informação, melhor o peptídeo,

seleção efetiva maior, e mais raro ele é na biblioteca; o número provável de clones independentes dentro da biblioteca ( $\lambda$ ). Observou-se, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação às suas frequências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que os fagos são específicos para NC.

#### 4.5. TESTE ELISA DOS PEPTÍDEOS CONTRA SORO HUMANO ESPECÍFICO

Para determinar o potencial diagnóstico dos peptídeos, foi testada a habilidade deles para reconhecer anticorpos presentes no soro específicos à metacestódeos de *T. solium*. O teste ELISA foi desenhado para capturar anticorpos das amostras de pacientes utilizando os mimetopos como antígenos de fase sólida.

A reatividade foi primeiramente testada no grupo de amostras positivas para NC, e dos 26 peptídeos quatro não apresentaram resultados satisfatórios (Cc7, Cc22, Cc23 e Cc24) e foram excluídos na análise dos soros dos pacientes com outras parasitoses e dos indivíduos saudáveis. Todas as 110 amostras de soro foram testadas contra 22 clones.

Após analisar as amostras do grupo 1, foi notada que as amostras com NC inativa apresentaram alta frequência de positividade ao passo que as amostras com NC ativa foram pouco reativas. Sensibilidade, especificidade e eficiência diagnóstica (ED) de cada mimetopo selecionado estão apresentadas na Tabela 4.

Em relação ao grupo 2, nenhum dos peptídeos testados reconheceram anticorpos presentes na amostra de soro dos pacientes positivos para *E. granulosus*, e as reações cruzadas mais frequentes foram: *H. nana*, *T. solium* (teníases) e *S. stercoralis* (Tabela 5).

Em relação ao grande número de fagotopos obtidos, as análises mais criteriosas foram realizadas nos clones que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros verificados acima. Desse modo, aqueles que apresentaram especificidade maior do que 85% (Cc6, Cc8, Cc25, Cc27, Cc30, Cc45 e Cc48) foram selecionados para análise estatística (Figure 11) e para alguns teste de bioinformática. O clone Cc48 apresentou ser o melhor em relação ao diagnóstico da NC, discriminando os pacientes ativos dos inativos e possuindo uma menor reação cruzada em relação aos fagos Cc6 e Cc8 ( $p = 0.0384$ ).

**Tabela 3.** Frequência observada e esperada, amplificação e grau de informação dos clones de peptídeos selecionados por *phage-display*.

Clone	Frequência Observada (FO) (%)	Probabilidade de Seqüência Randômica (FE)	Amplificação (FO/FE)	l(m)	$\lambda$
Cc10	3/30 (10,0%)	$7,4 \times 10^{-16}$	$1,3 \times 10^{14}$	34,8	$1,5 \times 10^{-6}$
Cc33	2/30 (6,7%)	$3,1 \times 10^{-14}$	$2,2 \times 10^{12}$	31,1	$6,2 \times 10^{-5}$
Cc12	2/30 (6,7%)	$5,3 \times 10^{-15}$	$1,3 \times 10^{13}$	32,9	$1,1 \times 10^{-5}$
Cc1	1/30 (3,3%)	$8,1 \times 10^{-15}$	$4,0 \times 10^{12}$	32,4	$1,6 \times 10^{-5}$
Cc6	1/30 (3,3%)	$5,0 \times 10^{-19}$	$6,5 \times 10^{17}$	42,1	$1,0 \times 10^{-9}$
Cc7	1/30 (3,3%)	$2,8 \times 10^{-16}$	$1,2 \times 10^{15}$	38,1	$5,6 \times 10^{-8}$
Cc8	1/30 (3,3%)	$6,9 \times 10^{-17}$	$4,8 \times 10^{14}$	37,2	$1,4 \times 10^{-7}$
Cc9	1/30 (3,3%)	$6,1 \times 10^{-13}$	$5,4 \times 10^{10}$	28,1	$1,2 \times 10^{-3}$
Cc11	1/30 (3,3%)	$3,5 \times 10^{-14}$	$9,5 \times 10^{11}$	31,0	$7,0 \times 10^{-5}$
Cc16	1/30 (3,3%)	$3,4 \times 10^{-12}$	$9,5 \times 10^9$	26,4	$6,9 \times 10^{-3}$
Cc19	1/30 (3,3%)	$4,0 \times 10^{-16}$	$8,3 \times 10^{13}$	35,5	$8,0 \times 10^{-7}$
Cc22	1/30 (3,3%)	$4,4 \times 10^{-17}$	$7,6 \times 10^{14}$	37,7	$8,7 \times 10^{-8}$
Cc23	1/30 (3,3%)	$3,4 \times 10^{-16}$	$9,7 \times 10^{13}$	35,6	$6,8 \times 10^{-7}$
Cc24	1/30 (3,3%)	$4,2 \times 10^{-12}$	$7,9 \times 10^9$	26,2	$8,4 \times 10^{-3}$
Cc25	1/30 (3,3%)	$1,4 \times 10^{-16}$	$2,4 \times 10^{14}$	36,5	$2,8 \times 10^{-7}$
Cc27	1/30 (3,3%)	$4,3 \times 10^{-14}$	$7,6 \times 10^{11}$	30,8	$8,7 \times 10^{-5}$
Cc30	1/30 (3,3%)	$2,0 \times 10^{-17}$	$1,6 \times 10^{15}$	38,4	$4,0 \times 10^{-8}$
Cc31	1/30 (3,3%)	$8,5 \times 10^{-14}$	$3,9 \times 10^{11}$	30,1	$1,7 \times 10^{-4}$
Cc32	1/30 (3,3%)	$2,2 \times 10^{-16}$	$1,5 \times 10^{14}$	36,1	$4,4 \times 10^{-7}$
Cc35	1/30 (3,3%)	$2,4 \times 10^{-16}$	$1,4 \times 10^{14}$	36,0	$4,7 \times 10^{-7}$
Cc37	1/30 (3,3%)	$3,9 \times 10^{-12}$	$8,5 \times 10^9$	26,3	$7,7 \times 10^{-3}$
Cc39	1/30 (3,3%)	$2,2 \times 10^{-17}$	$1,5 \times 10^{15}$	38,4	$4,4 \times 10^{-8}$
Cc40	1/30 (3,3%)	$4,0 \times 10^{-19}$	$8,2 \times 10^{16}$	42,4	$8,0 \times 10^{-10}$
Cc44	1/30 (3,3%)	$3,2 \times 10^{-18}$	$1,0 \times 10^{16}$	40,3	$6,3 \times 10^{-9}$
Cc45	1/30 (3,3%)	$1,5 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{14}$	36,5	$2,9 \times 10^{-7}$
Cc48	1/30 (3,3%)	$4,0 \times 10^{-14}$	$8,2 \times 10^{11}$	30,8	$8,1 \times 10^{-5}$

FE = frequência esperada na biblioteca = Probabilidade de seqüência randômica; l(m) = grau de informação =  $-\ln$  (probabilidade de seqüência randômica);  $\lambda$  = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde: complexidade da biblioteca =  $\sim 2 \times 10^9$ .

**Tabela 4.** Sensibilidade, Especificidade e Eficiência Diagnóstica dos vinte e dois mimetopos selecionados para o diagnóstico de neurocisticercose.

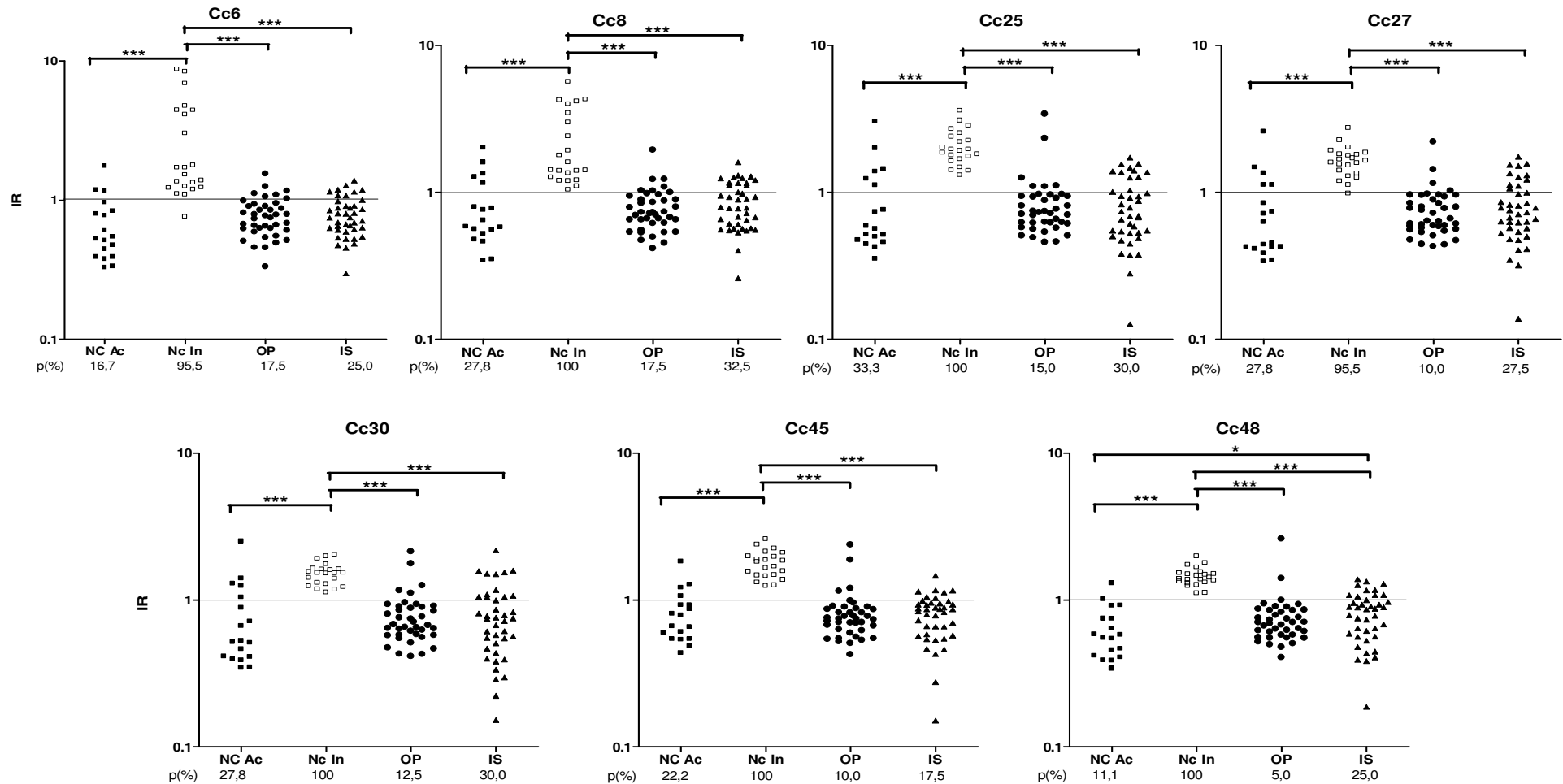
<b>Mimetopo</b>	<b>Sen (%)</b>			<b>Esp (%)</b>	<b>ED (%)</b>		
	<b>NC</b>	<b>At</b>	<b>In</b>		<b>NC</b>	<b>At</b>	<b>In</b>
<b>Cc1</b>	60,0	16,7	95,5	75,7	70,0	63,6	80,4
<b>Cc6</b>	60,0	16,7	95,5	87,1	77,2	72,7	89,1
<b>Cc8</b>	67,5	27,8	100	85,7	79,1	73,9	89,1
<b>Cc9</b>	70,0	33,3	100	68,6	69,1	61,4	76,1
<b>Cc10</b>	65,0	22,2	100	82,9	76,4	70,5	87,0
<b>Cc11</b>	65,0	22,2	100	77,1	72,7	65,9	82,6
<b>Cc12</b>	62,5	22,2	95,5	78,6	72,7	67,0	82,6
<b>Cc16</b>	65,0	22,2	100	75,7	71,8	64,8	81,5
<b>Cc19</b>	67,5	27,8	100	77,1	73,6	67,0	82,6
<b>Cc25</b>	70,0	33,3	100	88,6	81,8	77,3	91,3
<b>Cc27</b>	65,0	27,8	95,5	91,4	81,8	78,4	92,4
<b>Cc30</b>	67,5	27,8	100	88,6	80,9	76,1	91,3
<b>Cc31</b>	72,5	38,9	100	71,4	71,8	64,8	78,3
<b>Cc32</b>	67,5	27,8	100	74,3	71,8	64,8	80,4
<b>Cc33</b>	67,5	27,8	100	80,0	75,5	69,3	84,8
<b>Cc35</b>	65,5	22,2	100	78,6	73,6	67,0	83,7
<b>Cc37</b>	62,5	16,7	100	78,6	72,7	65,9	83,7
<b>Cc39</b>	60,0	16,7	95,5	77,1	70,9	64,8	81,5
<b>Cc40</b>	57,5	16,7	90,9	77,1	70,0	64,8	80,4
<b>Cc44</b>	65,0	27,8	95,5	82,9	76,4	71,6	85,9
<b>Cc45</b>	65,0	22,2	100	90,0	76,4	76,1	92,4
<b>Cc48</b>	60,0	11,1	100	94,3	81,8	77,3	95,7

Sen = sensibilidade; Esp = especificidade; ED = eficiência diagnóstica; NC = pacientes com neurocisticercose (n = 40); At = subgrupo de pacientes com neurocisticercose ativa (n = 18); In = subgrupo de pacientes com neurocisticercose inativa (n = 22).



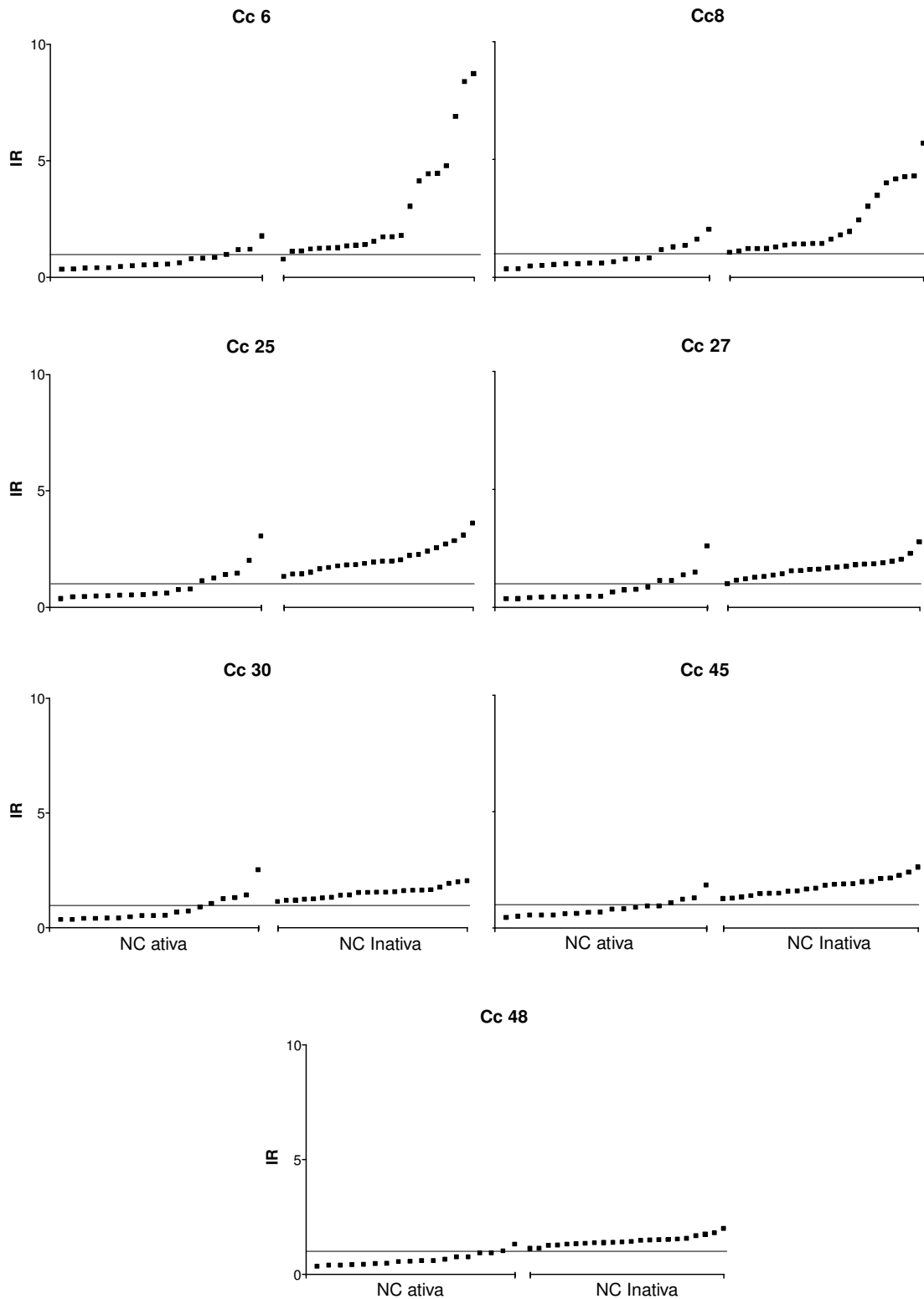
**Tabela 5.** Reatividade cruzada com outras parasitoses (grupo 2, n = 40) através da detecção de IgG no ELISA com os mimetopos seleccionados.

Parasitos	Mimetopos																					
	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc	Cc
	1	6	8	9	10	11	12	16	19	25	27	30	31	32	33	35	37	39	40	44	45	48
Ancilostomídeos (5)	2	1	2	3	1	0	1	0	0	0	1	1	3	3	3	2	3	2	2	2	0	0
<i>A. lumbricoides</i> (5)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	1	2	1	0	0	0	0
<i>E. vermicularis</i> (5)	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>S. stercoralis</i> (5)	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	1	2	2	1	1	2	2	2	0	0	0
<i>Taenia</i> sp (5)	0	1	1	2	2	1	3	2	4	4	1	1	4	2	2	2	1	1	2	2	2	1
<i>T. trichiura</i> (5)	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
<i>H. nana</i> (4)	0	1	1	3	1	3	2	3	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. mansoni</i> (3)	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>E. granulosus</i> (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total (40)</b>	6	7	7	14	7	8	11	10	8	6	4	5	15	12	10	7	10	10	8	7	4	2



**Figura 11.** Detecção de anticorpos IgG no soro de pacientes com neurocisticercose ativa (NC Ac, n = 18) e inativa (NC In, n = 22), outras parasitoses (OP, n = 40) e indivíduos saudáveis (IS, n = 30) no teste ELISA. IR = índice de reatividade; Linha horizontal = *cut-off*; p(%) = positividade em porcentagem. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Analisando o perfil de cada mimetopo na detecção de anticorpos IgG no soro é possível visualizar que o índice de reatividade é crescente partindo da fase ativa em direção à fase inativa, passando pela fase mista (Figura 12). Apesar de não ser possível fazer uma relação de tempo de infecção e detecção de anticorpo, pode-se observar que em geral o IR dos mimetopos vai aumentando de acordo com a progressão da clínica da doença. Assim os menores valores de reatividade estão entre os pacientes com neurocisticercose ativa.



**Figura 12.** Comparação na detecção de anticorpo IgG no soro de pacientes com neurocisticercose ativa (n = 18) e inativa (n = 22). Dados apresentadores em valores crescentes de índice de reatividade (IR) (∴ a seqüência de valores não tem correspondência entre os clones).

#### 4.6. ANÁLISE DE DADOS POR BIOINFORMÁTICA

A tradução das seqüências de DNA foi realizada pelo programa DNA2PRO12, e o cálculo da freqüência total de cada aminoácido e em cada posição dos peptídeos seqüenciados pelo programa AAFREQ. O fato das bibliotecas serem de peptídeos randômicos permite que vários clones possam compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes do peptídeo, fazendo com que certos aminoácidos sejam mais freqüentes após a seleção e seqüenciamento. Logo, a alta freqüência desses aminoácidos, nas referidas posições do peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias seqüências. A Tabela 6 mostra quais os aminoácidos mais freqüente e qual o aminoácido mais selecionado por posição (consenso).

**Tabela 6.** Freqüência dos aminoácidos dos peptídeos por posição (AAFREQ).

AA*	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	Total	Freqüência
A	2	0	0	0	2	1	0	0	1	2	0	0	8	2,56%
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00%
D	2	2	0	2	1	2	1	0	0	1	0	1	12	3,85%
E	0	1	0	2	0	1	0	1	1	0	1	0	7	2,24%
F	1	2	2	1	2	0	3	0	2	1	2	2	18	5,77%
G	<b>4</b>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	2	10	3,21%
H	1	4	0	0	2	2	1	1	2	0	2	2	17	5,45%
I	0	2	1	3	1	0	2	0	0	0	0	1	10	3,21%
K	2	0	2	0	0	1	0	0	0	1	2	1	9	2,88%
L	<b>4</b>	2	3	1	<b>5</b>	1	3	3	2	2	<b>4</b>	2	32	10,26%
M	0	1	0	2	0	1	1	1	2	1	1	0	10	3,21%
N	0	0	3	3	0	1	1	2	2	2	1	1	16	5,13%
P	0	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	2	2	4	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	47	15,06%
Q	0	0	1	1	0	0	1	1	2	0	1	1	8	2,56%
R	0	0	3	0	1	3	2	2	<b>3</b>	2	0	3	19	6,09%
S	<b>4</b>	2	2	2	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	3	<b>3</b>	3	1	0	37	11,86%
T	3	2	2	1	3	1	0	2	0	3	2	2	21	6,73%
V	1	2	0	1	1	1	0	3	1	1	1	1	13	4,17%
W	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	5	1,60%
Y	2	0	1	1	0	1	1	2	1	2	2	0	13	4,17%
Consenso	G/L/S	P	P	P	L/S	S	S	P	P/R/S	P	L/P	P		

\*AA = aminoácidos; # indica a posição do aminoácido dentro do peptídeo apresentado no fago, que contém doze aminoácidos.

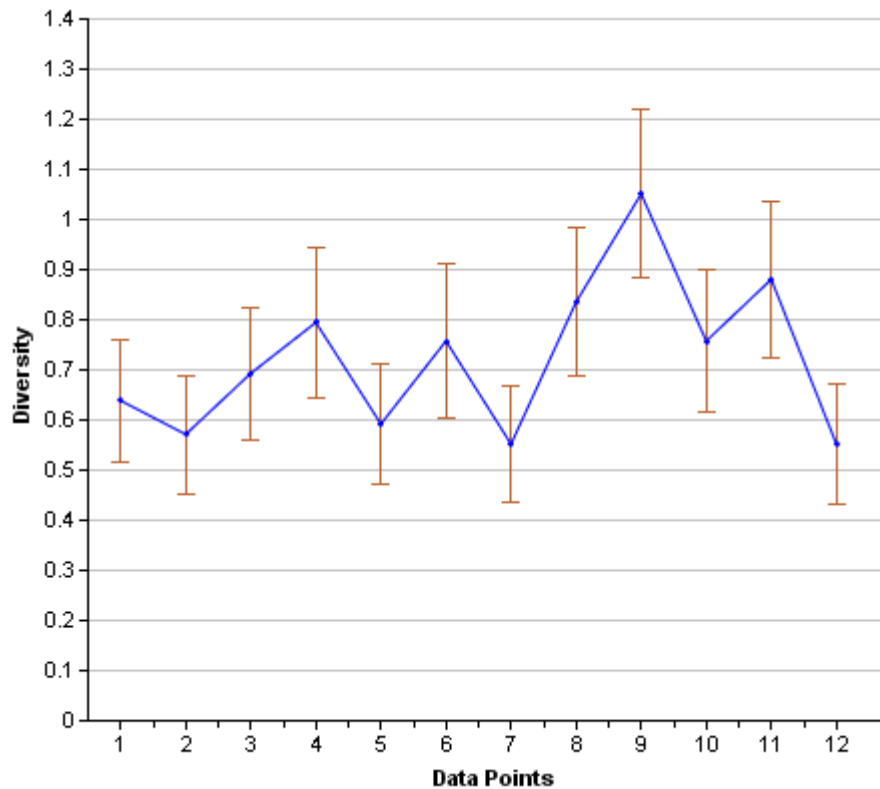
A comparação entre a frequência dos vinte aminoácidos presentes nos peptídeos ligantes e a frequência esperada dos aminoácidos na biblioteca original está apresentada na Tabela 7. Pôde ser observado que, houve uma seleção eficiente, pelo fato dos aminoácidos Alanina, Cisteína, Glicina, Glutamina, Arginina, Valina e Triptofano terem a frequência observada significativamente menor que a frequência esperada, sendo selecionados negativamente. Os aminoácidos Fenilalanina, Histidina, Asparagina e Prolina foram selecionados positivamente.

**Tabela 7.** Frequência dos aminoácidos individuais dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelas IgG e a frequência esperada dos aminoácidos na construção da biblioteca realizado pelo AAFREQ.

Aminoácidos		Frequência		<i>p</i>
		Esperada*	Observada (n+/n total)	
A (Alanina)	Ala	6,2%	2,6% (8/312)	< 0.0001
C (Cisteína)	Cis	3,1%	0,00% (0/312)	< 0.0001
D (Aspartato)	Asp	3,1%	3,9% (12/312)	0.1652
E (Glutamato)	Glu	3,1%	2,2% (7/312)	0.1051
F (Fenilalanina)	Fen	3,1%	5,8% (18/312)	0.0017
G (Glicina)	Gly	6,2%	3,2% (10/312)	0.0008
H (Histidina)	His	3,1%	5,5% (17/312)	0.0041
I (Isoleucina)	Ile	3,1%	3,2% (10/312)	0.4491
K (Lisina)	Lys	3,1%	2,9% (9/312)	0.3966
L (Leucina)	Leu	9,4%	10,3% (32/312)	0.2497
M (Metionina)	Met	3,1%	3,2% (10/312)	0.4491
N (Asparagina)	Asn	3,1%	5,1% (16/312)	0.0121
P (Prolina)	Pro	6,2%	15,1% (47/312)	< 0.0001
Q (Glutamina)	Gln	6,2%	2,6% (8/312)	< 0.0001
R (Arginina)	Arg	9,4%	6,1% (19/312)	0.0029
S (Serina)	Ser	9,4%	11,9% (37/312)	0.0350
T (Treonina)	Thr	6,2%	6,7% (21/312)	0.3245
V (Valina)	Val	6,2%	4,2% (13/312)	0.0220
W (Triptofano)	Trp	3,1%	1,6% (5/312)	0.0134
Y (Tirosina)	Tyr	3,1%	4,2% (13/312)	0.0948

\* Frequência esperada = n°. de códons para aquele aminoácido ÷ 32 códons x 100%.

A Figura 13 gerada pelo programa DIVAA, que calcula a diversidade de aminoácidos em cada uma das 12 posições dos peptídeos, mostrando as posições onde ocorreu a maior diversidade de aminoácidos e onde houve menor diversidade de aminoácidos. Observa-se que as posições de maior diversidade de aminoácidos são a 4, 6, 9 e 11, e as posições de menor diversidade são a 2, 5, 7, 10 e 12. Combinando os dados do resultado da frequência de aminoácidos com os de diversidade pode-se observar que as posições de menor variabilidade de aminoácido (2, 5, 7, 10 e 12) foram as que apresentam maior frequência de Leucina, Prolina ou Serina.



**Figura 13.** Diversidade de sucessão dos aminoácidos em cada posição nos peptídeos.

Foi feita a busca por seqüências consenso (motivos) de 3 aminoácidos através do programa MOTIF2. Na Tabela 8 estão apresentados os 130 motivos encontrados.

**Tabela 8.** Sequências consenso encontradas (n = 130) entre os peptídeos selecionados.

<b>Sequências consenso</b>	<b>Peptídeos alinhados</b>
sxxxxpxp	--s----p-p--
	s----p-p----
	----s----p-p
	----s----p-p
lxxlxpx	----l--l--p-
	-l--l--p---
	l--l--p-----
lpxl	-lp-l-----
	-lp-l-----
	lp-l-----
lpxxxxp	-lp----p----
	lp----p-----
	lp----p-----
lxxxxpxpxp	--l-----p--p
	l-----p--p--
	l-----p--p--
lxxxxsp	-l---s-p----
	---l---s-p--
	l---s-p-----
pxsp	-----p-sp-
	-----p-sp
	-----p-sp--
sfxp	-----sf-p---
	sf-p-----
	-----sf-p---
spxpxp	----s-p--p--
	----s-p--p--
	-----s-p--p
txsxxxxp	-t-s----p--
	-t-s----p--
	---t-s----p



axfxp	----a-f-p--- a-f-p-----
axxxpxf	-----a---p-f a---p-f-----
asxp	----as-p---- -----as-p
dxnxl	---d-n-l---- d-n-l-----
dxnxxxxy	----d-n---y- d-n---y-----
dps	----dps---- -dps-----
exxsp	-e--sp----- -----e--sp
fxxxxxhn	--f----hn-- ----f----hn
fxxxxxhxxp	--f----h--p -f----h--p-
fxp	-----fp-p-- -----fp-p
fxxtxxh	---f--t--h- -f--t--h----
fxxxxth	--f----th-- ----f----th-
fxxxxtn	--f----t-n-- ----f----t-n
gpxxs	g-p--s----- g-p--s-----
hxxxlt	-----h---lt ----h---lt--
hnxl	-hn-l----- -----hn-l

hxpxxxxxxxxh	-h-p-----h h-p-----h-
hpxxxxt	-----hp---t hp---t-----
hxxsl	-h-s-l----- ----h-s-l---
hsxxxxp	-hs----p---- ----hs----p
ixexm	---i-e-m---- -----i-e-m-
ixxxpxxp	---i---p--p- ----i---p--p
ixss	-----i-ss-- ----i-ss----
ixsxy	---i--s--y-- ----i--s--y-
kxxxxxxxxlt	--k-----lt --k-----lt
lxxly	---l--ly--- -l--ly-----
lxxxxxne	--l-----ne- l-----ne---
lxnl	-l-nl----- l-nl-----
lxxxxxpl	---l-----pl --l-----pl--
lpn	-lpn----- lpn-----
lpxxxxxxxxp	lp-----p-- lp-----p--
lpxxs	-lp--s----- lp--s-----

lxxxxpxs	--l----p-s- l----p-s---
lxxxxxe	--l-r----e- l-r----e---
lxxxxxn	--l-r----n-- l-r----n----
lxrp	-----l-rp- l-rp-----
lxxxxrp	----l----rp- l----rp-----
lsp	-----lsp ----lsp-----
lxxxxxsp	--l-----sp l-----sp--
lxsq	-----l-sq- ----l-sq----
lxxxss	----l---ss-- ---l---ss---
lvxxxxxp	lv----p---- --lv----p--
mlxxx f	----ml---f- ---ml---f---
nxxxxrp	-----n---rp- --n---rp----
paxxp	---pa--p---- -----pa--p
pas	---pas----- -----pas--
pxfxl	-----p-f-l- --p-f-l-----
pxxxxxfp	---p-----fp -pl-----fp--

pxxxlf	-----p---lf -----p---lf
pxxxxxlxxxl	-p-----l---l -p-----l---l
plxpx	-----pl-p -----pl-p
plxpxp	--p-l--p---- -p-l--p-----
pxxlt	-----p--lt ---p---lt----
pxml	---p-ml----- -----p-ml-
pnl	--pnl----- -pnl-----
ppg	-----ppg- -ppg-----
ppxxxl	--pp---l---- -pp---l-----
pxpxpxp	---p--p--p-- ----p--p--p-
pxxxxpp	---p---pp--- --p---pp----
pxxxxpp	---p---pp-- -----p---pp
pxxxxpxpxp	-p---p--p-- -p---p--p--
pxxxxqxy	-p---q-y--- --p---q-y--
prp	-----prp--- -prp-----
pxrxxs	---p-r--s--- ----p-r--s--

pxsxxxxf	-p--s---f--- --p--s---f--
psxp	---ps-p----- -----ps-p--
psxxxxp	---ps----p-- ----os----p-
pxsxp	---p-s-p---- -----p-s-p
pxsxp	--p--s-p---- -p--s-p-----
pss	-----pss---- -----pss---
pxxxxxss	--p-----ss-- -p-----ss---
psxxxv	---ps---v--- --ps---v----
pxxtxxn	-p--t--n---- --p--t--n---
rxxxxne	----r----ne- --r----ne---
rxnxl	--r--n-l---- -----r--n-l
rpxxxn	--rp---n---- -----rp---n-
rpxxp	-----rp--p- -----rp--p--
sxxfk	-----s--fk -----s--fk-
sxxfk	-----s---fk -----s---fk-
sxxxxfk	----s-----fk ---s-----fk-

sxxfxxxxl	-s--f----l-- s--f----l---
sxxxfp	--s---fp---- ----s---fp--
sxxxfxp	--s---f--p-- ----s---f--p
spxxxxf	----sp----f- ----sp----f
spp	-----spp ----spp----
sxxxpp	s---pp----- -----s---pp
sxxxxxxp	s-----p--p- -s-----p--p
spxs	--sp-s----- ----sp-s----
sxxxxxpxs	s-----p-s-- -s-----p-s-
srxrp	-----s-r--p- -----s-r--p
sxxrxp	----s--r--p-- -----s--r--p
ssxxf	-----ss--f- -----ss--f--
sxsxxxf	----s-s---f- ---s-s---f--
sxxsxxf	----s--s--f- ---s--s--f--
sxxsxxxg	--s--s----g- ---s--s----g
ssxxxk	-----ss---k -----ss---k-

sxsxxxxk	----s-s----k ---s-s----k-
sxxsxxxxk	----s--s---k ---s--s---k-
ssp	-----ssp-- -----ssp---
sxxxxxxxxxsp	s-----sp- -s-----sp
ssxr	-----ss-r ----ss-r---
sxss	----s-ss---- ---s-ss-----
sxxsv	---s--sv---- ---s--sv----
sxxwxp	-----s--w-p- ----s--w-p--
txxxaxxp	-t---a---p-- t---a---p---
thn	-----thn-- -----thn
thxxxxxp	th----p---- ---th----p
ths	ths----- ---ths-----
txpxxxxxp	t-p-----p-- t-p-----p--
txxxpxxp	-t---p--p-- ---t---p--p
txxxsxl	--t---s-l--- ---t---s-l--
txsxxxxp	t-s----p---- ----t-s----p

txsxp	-t--s-p----- ---t--s-p---
txsxr	----t-s-r--- ----t-s-r---
vxxxhxxxxxt	-v---h-----t v---h-----t-
wdp	-----wdp- ----wdp-----
wxsp	--w-sp----- ----w-sp---
yxxxxrxp	--y----r-p-- ---y----r-p-
yxssxr	--y-s--r---- -----y-s--r
yxxsxr	-----y--s-r ---y--s-r---

O pareamento dos peptídeos selecionados foi realizado utilizando programa CLUSTAL W, e não gerou motivos entre eles.

Não foram encontradas homologias completas nas investigações realizadas nas seqüências de proteínas de espécies de tenídeos do *GeneBank* pelo BLASTp com o banco de dados BLAST. Os peptídeos apresentaram similaridade com algumas proteínas de diversas espécies de tenídeos, porém foram selecionadas aquelas relacionadas às espécies *T. solium* e *T. saginata*, devido à proximidade dessas espécies com o homem, uma vez que ambas causam teníase e a primeira também provoca NC, e pelo fato de essas serem as principais espécies de tenídeos encontradas no Brasil. A Tabela 9 apresenta as principais proteínas, com *Score* maior do que 15, encontradas na pesquisa pelo BLAST com alinhamento aos sete melhores peptídeos selecionados.

Para análise da região de similaridade máxima das proteínas associadas aos tenídeos com os clones selecionados, foi utilizado o programa MATCH. A Tabela 10 apresenta as regiões de similaridade com as principais proteínas que apresentaram regiões similares com mais de um clone.



**Tabela 9.** Alinhamento das seqüências protéicas dos peptídeos selecionados com proteínas armazenadas no banco de dados do *GeneBank* pelo BLAST.

<b>Peptídeo</b>	<b>Proteínas do BLAST</b>	<b>Nº. de Acesso</b>
Cc6	1) Ts3 protein [ <i>T. solium</i> ]	1) ABY56687
	2) 17H protein [ <i>T. solium</i> ]	2) CAD61333
Cc8	1) NADH dehydrogenase subunit 5 [ <i>T. saginata</i> ]	1) YP_001527645
	2) TGTP1 [ <i>T. solium</i> ]	2) AAB05911
	3) putative mitotic checkpoint protein [ <i>T. solium</i> ]	3) CAD21526
	4) hypothetical protein [ <i>T. solium</i> ]	4) CAD21543
	5) NADH dehydrogenase subunit 5 [ <i>T. solium</i> ]	5) NP_659224
Cc25	1) c-jun [ <i>T. solium</i> ]	1) AAS88553
Cc27	1) paramyosin [ <i>T. solium</i> ]	1) AAT94289
	2) oncosphere protein Tso31d [ <i>T. solium</i> ]	2) ABH07376
	3) oncosphere protein Tso31a [ <i>T. solium</i> ]	3) AAW88556
	4) peptidylprolyl isomerase [ <i>T. solium</i> ]	4) AAT99423
	5) activated oncosphere TSO45-5B [ <i>T. solium</i> ]	5) AAK31945
	6) TSO45-B1 [ <i>T. solium</i> ]	6) AAM88220
	7) activated oncosphere TSO45-5A [ <i>T. solium</i> ]	7) AAK31943
	8) TSO45-B8 [ <i>T. solium</i> ]	8) AAM8822
	9) TSO45-A4 [ <i>T. solium</i> ]	9) AAM88224
	10) TSO45-A1 [ <i>T. solium</i> ]	10) AAM88216
	11) TSO45-B11 [ <i>T. solium</i> ]	11) AAM88222
	12) hypothetical protein [ <i>T. solium</i> ]	12) CAD21543
	13) cytochrome c oxidase subunit 1 [ <i>T. solium</i> ]	13) BAE53694
	14) low molecular weight antigen 2 [ <i>T. solium</i> ]	14) BAE96722
	15) 8 kDa diagnostic antigen TsRS1 [ <i>T. solium</i> ]	15) AAM00210
Cc30	1) c-fos [ <i>T. solium</i> ]	1) AAS88555
	2) ATPase subunit 6 [ <i>T. saginata</i> ]	2) BAC98841
	3) NADH dehydrogenase subunit 2 [ <i>T. saginata</i> ]	3) YP_001527639
	4) NADH dehydrogenase subunit 2 [ <i>T. solium</i> ]	4) NP_659230
	5) hypothetical protein [ <i>T. solium</i> ]	5) CAD21543
Cc45	1) filamin [ <i>T. solium</i> ]	1) CAK96164.1
	2) paramyosin [ <i>T. solium</i> ]	2) AAT94289

---

Cc48	1) putative nucleoside triphosphate kinase [ <i>T. solium</i> ]	1) CAD21552.1
	2) Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha [ <i>T. solium</i> ]	2) Q6RWA9
	3) hypothetical protein [ <i>T. solium</i> ]	3) CAD21543
	4) paramyosin [ <i>T. solium</i> ]	4) AAT94289

---

**Tabela 10.** Fagos que apresentaram máxima similaridade com as proteínas encontradas no banco de dados do programa BLAST, através do programa MATCH, apresentando a posição do aminoácido com máxima similaridade entre os peptídeos selecionados e as proteínas.

<b>Proteína</b>	<b>Peptídeos com máxima similaridade com a proteína</b>	<b>Posição de máxima similaridade</b>
NADH dehydrogenase subunit 5 [ <i>T. solium</i> ]	Cc24; Cc40	478
c-fos [ <i>T. solium</i> ]	Cc22; Cc39; Cc40	245
hypothetical protein [ <i>T. solium</i> ]	Cc1; Cc23; Cc39	22
cytochrome c oxidase subunit 1 [ <i>T. solium</i> ]	Cc22; Cc24	63
paramyosin [ <i>T. solium</i> ]	Cc27	312
NADH dehydrogenase subunit 2 [ <i>T. solium</i> ]	Cc19	8
Ts3 protein [ <i>T. solium</i> ]	Cc6; Cc22	108
17H protein [ <i>T. solium</i> ]	Cc6; Cc40	90
cytochrome c oxidase subunit I [ <i>T. saginata</i> ]	Cc24; cc24; Cc30; Cc48	220
NADH dehydrogenase subunit 5 [ <i>T. saginata</i> ]	Cc10; Cc24; Cc40	479
TGTP1 [ <i>T. solium</i> ]	Cc30; cc39	321
putative mitotic checkpoint protein [ <i>T. solium</i> ]	Cc8; Cc23; Cc48	101
activated oncosphere TSO45-5B [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	127
TSO45-B1 [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	127
TSO45-B8 [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	127
TSO45-B11 [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	127
activated oncosphere TSO45-5A [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	228
TSO45-A1 [ <i>T. solium</i> ]	Cc19; Cc27; Cc44	228
TSO45-A4 [ <i>T. solium</i> ]	Cc24; Cc33	37
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha [ <i>T. solium</i> ]	Cc48	142
filamin [ <i>T. solium</i> ]	Cc7; Cc45	510
oncosphere protein Tso31d [ <i>T. solium</i> ]	Cc27	111
oncosphere protein Tso31a [ <i>T. solium</i> ]	Cc24; Cc27	111
peptidylprolyl isomerase [ <i>T. solium</i> ]	Sem similaridade	
low molecular weight antigen 2 [ <i>T. solium</i> ]	Sem similaridade	
8 kDa diagnostic antigen TsRS1 [ <i>T. solium</i> ]	Sem similaridade	

---

ATPase subunit 6 [ <i>T. saginata</i> ]	Cc35	107
NADH dehydrogenase subunit 2 [ <i>T. saginata</i> ]	Cc8	241
monoclonal antibody HP6 [ <i>T. saginata</i> ]	Cc7; Cc33	46
putative nucleoside triphosphate kinase [ <i>T.</i> <i>solium</i> ]	Cc39; Cc48	80
c-jun [ <i>T. solium</i> ]	Cc25; Cc45	381

---

## 5. DISCUSSÃO

Em busca de testar o potencial diagnóstico dos fagotopos selecionados no *biopanning* utilizando IgY purificada do soro hiperimune anti-matacestódeo *T. solium*, os mimetopos usados no ELISA contra um painel de amostras de soro e a aplicação da biblioteca de fagos proveu reagentes úteis no diagnóstico diferencial das fases da NC. A melhora no diagnóstico da NC é necessária e desejada, sendo verdadeiramente importante desde que a NC se encontra entre as infecções parasitárias mais graves e vem expandindo mundialmente a cada ano (PAWLOWSKI, 2006). Apesar dos testes imunológicos contribuírem para o diagnóstico da NC, sabe-se que eles não podem substituir a neuroimagem no manejo clínico (DORNY et al., 2003).

Os resultados obtidos indicam que os mimetopos selecionados podem distinguir NC ativa da forma inativa. Os fagotopos foram capazes de detectar significativamente os pacientes com NC inativa. A classificação da NC em formas ativa e inativa baseia-se na associação da resposta imunológica e dos estudos de neuroimagem. Na forma ativa existem cisticercos no estágio vesicular ou em degeneração circundado por uma intensa reação inflamatória no tecido cerebral adjacente, ao passo que na forma inativa os pacientes apresentam lesões calcificadas e mínima resposta imunológica (SOTELO et al., 1985; SALGADO et al., 1997; CASTILHO, 2004).

Na literatura há relatos de que pacientes com NC ativa são mais reativos. O antígeno CyDA, denominado antígeno diagnóstico da cisticercose, é uma proteína do metacestódeo de *T. solium* que mostrou potencial na diferenciação sorológica da NC ativa de NC inativa e de outras infecções parasitárias (CHUNG et al., 1999). Molinari et al. (2002) demonstrou que antígenos excretórios/secretórios de *T. solium* têm forte capacidade na discriminação das formas ativa e inativa da NC, sendo que casos com único metacestódeo viável teve o maior valor de DO no ELISA, valores intermediários de DO positiva relacionavam-se com pacientes com metacestódeo viável mais lesões transitórias, e os valores mais baixos correspondiam a casos com cisticercos viáveis e lesões calcificadas, em contraste, os valores negativos foram detectados em todos os casos com cisticercos calcificados. No estudo de Barcelos et al. (2005) utilizando extratos antigênicos de *T. crassiceps*, pacientes com NC ativa tinham os níveis mais altos de IgG específica tanto em amostras de soro quanto em LCR, possivelmente pelo fato da resposta imunológica ser maximizada quando os parasitos estão na fase degenerativa. Empregando o método imunodiagnóstico *Western Blot* e usando extrato bruto de metacestódeo de *T. solium*, a distinção entre pacientes com NC ativa e inativa revelou

sensibilidade de 80% - 100% no LCR dos casos de NC ativa e de 0 - 30% nos pacientes inativos, com especificidade de 100% em ambas as formas de NC (BARCELOS et al., 2007).

Na tentativa de encontrar uma explicação plausível para o maior reconhecimento dos casos de NC inativa neste estudo, algumas hipóteses foram levantadas. Uma delas refere-se à diferença no perfil imunológico de cada fase. Os cisticercos viáveis causam infecção assintomática através de evasão e supressão da imunidade, ao contrário, a inflamação ao redor de cisticercos em degeneração pode elicitar a doença sintomática (WHITE JR; ROBINSON; KUHN, 1997; BARCELOS et al., 2007; SCIUTTO et al., 2007), o que explica a positividade encontrada nos pacientes com NC ativa, uma vez que aqueles positivos apresentavam cisticercos em degeneração. Apesar de os pacientes com NC assintomática, devido às lesões calcificadas, poderem refletir infecções resolvidas há meses ou até anos, e isso pode estar associado a um decréscimo progressivo dos níveis de anticorpos (CHAVARRÍA et al., 2003), estudos demonstraram que a avidéz dos anticorpos aumenta com o tempo após o desafio antigênico (DZIEMIAN et al., 2008). Assim, é possível que os pacientes com NC inativa apresentem baixo níveis de anticorpos, porém os anticorpos residuais presentes seriam mais ávidos ao antígeno do que aqueles presentes no soro de pacientes com NC ativa.

O tipo de imunização utilizada, com o emprego de galinhas, pode oferecer várias vantagens: 1) galinhas produzem maior quantidade de anticorpos do que outros animais podem produzir durante o mesmo período, e 2) o cuidado animal custa menos. Porém, como essa foi a primeira vez que galinhas foram imunizadas com extrato salino de metacestódeos de *T. solium*, o perfil de mimetopos gerados com a utilização da IgY detectaram predominantemente os casos de NC inativa. Devido à distância evolucionária entre a galinha e o cisticercos, as galinhas reagem contra mais epítomos do que os anticorpos dos seres humanos, que estão relacionados evolucionariamente à *T. solium*, o que provê uma amplificação do sinal (CARLANDER; STÅLBERG; LARSSON, 1998). E devido à sua complexidade, é esperado que o metacestódeo expresse diversos perfis de antígenos (YAKOLEFF-GREENHOUSE et al., 1982), entretanto, os animais podem ter respondido à epitopos relacionados mais ao perfil calcificado do que ao da NC ativa. E não se pode deixar de considerar que a formação da diversidade gênica é diferente nos humanos e nas galinhas. Nos humanos, os segmentos gênicos funcionais V, D e J existem em largos *clusters* e a recombinação gera diversidade combinatorial através de sorteios aleatórios de segmentos individuais de V, D, e J, além da hipermutação somática e recombinação no *switch* de classe de Ig. Nas galinhas, onde somente segmentos funcionais únicos de V e J estão presentes, a diversidade é introduzida pela conversão gênica usando os pseudogenes em combinação com

hipermutação somática (HONJO; KINOSHITA; MURAMATSU, 2002; ARAKAWA; BUERSTEDDE, 2004).

Outro fator a ser considerado é o adjuvante utilizado na imunização, o adjuvante de Freund. Apesar de o adjuvante auxiliar na produção de altos títulos de anticorpos com alta afinidade e avidéz, o componente micobacteriano tende a produzir um tipo de hipersensibilidade tardia e deslocar a resposta imunológica para o perfil Th1 (STILLS JR, 2005). Adicionalmente, as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com NC ativa produziram IL-4, IL-12 e TNF-alfa, enquanto que pacientes com NC inativa produziram IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-alfa (BUENO et al., 2001b; BUENO et al., 2004). Também ocorre diferenças significativas nos perfis imunológicos de indivíduos que vivem em regiões não endêmicas com aqueles de comunidades rurais altamente endêmicas, que têm níveis mais elevados de proliferação de linfócitos antígeno-específicos e de IgG, e um perfil de citocinas misto entre TH1/TH2 caracterizado pela produção de IL10 e de TNF $\alpha$  (SCIUTTO et al., 2007).

Em relação à reatividade cruzada do teste ELISA com os mimetopos selecionados, o grupo de pacientes com outras parasitoses é representativo da população geral, particularmente em países em desenvolvimento. Entre as reações cruzadas ocorridas, a com *H. nana*, que já foi evidenciada, está relacionada à proximidade filogenética entre *Taenia* sp. e *Hymenolepis* sp., e à presença de componentes antigênicos comuns entre estas espécies (MONTENEGRO et al, 1994; SHIGUEKAWA et al., 2000). A reatividade com soro de pacientes com infecção por *S. stercoralis* pode estar relacionada à infecção dos indivíduos por ambos parasitos e a presença de anticorpos residuais, pois a cidade de Uberlândia está localizada em uma região endêmica para cisticercose humana (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006), e hiperendêmica para *S. stercoralis* (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998). A reatividade cruzada com *S. mansoni* pode ser explicada pela presença de epítomos antigênicos compartilhados entre as espécies, pois existe homologia entre a seqüência de aminoácidos da paramiosina de *S. mansoni* e o antígeno B de *T. solium* (LACLETTE et al., 1991; ISHIDA et al., 2003).

A falta de reatividade cruzada com soros positivos para *E. granulosus* no presente teste, é um progresso em relação à maioria dos outros antígenos atualmente utilizados no diagnóstico da NC, que apresentam reatividade com tal parasito, devido à presença de componentes antigênicos comuns, pois essas espécies pertencem a mesma família taxonômica (Taeniidae) (ISHIDA et al., 2006; MACHADO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Entre os melhores fagotopos, a sensibilidade variou entre 95,5% a 100% para NC inativa e 11,1% a 27,8% em relação à NC ativa. Em respeito à especificidade, os valores do ELISA variaram entre 85,7% a 94,3%, sendo esses valores similares ou até mesmo melhores do que aqueles postados por outros autores utilizando extratos totais de metacestódeos, nos quais a especificidade esteve entre 80% e 98,6% (SHIGUEKAWA et al., 2000; BUENO et al., 2001b; PERALTA et al., 2002; BUENO et al., 2005; FERRER et al., 2005; HANCOCK et al., 2006; SILVA et al., 2006; MACHADO et al., 2007).

A frequência de cada aminoácido dos clones seqüenciados, apresentada pelo programa AAFREQ, revelou que os aminoácidos mais freqüentes foram L, P e S. O fato das bibliotecas serem de peptídeos randômicos permite que vários clones possam compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes, fazendo com que certos aminoácidos sejam mais freqüentes após a seleção. A alta freqüência desses aminoácidos, nas referidas posições do peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias seqüências.

O resultado dos alinhamentos demonstrou que os peptídeos selecionados apresentam similaridades com proteínas relacionadas à *T. solium* e *T. saginata* previamente depositadas em banco de dados. Em relação àqueles fagos com os melhores resultados no ELISA para detecção de IgG específicas para metacestódeos de *T. solium*, o fago Cc6 foi similar às proteínas Ts3 e 17H; o Cc8 à proteína *putative mitotic checkpoint* e à NADH desidrogenase subunidade 2; Cc25 foi similar à c-jun; Cc 27 correlacionou-se às proteínas da família TSO45 e Tso31, e à paramiosina; Cc30 à TGTP1; Cc45 à filamina e c-jun; Cc48 teve máxima similaridade com citocromo c oxidase subunidade I, proteína *putative mitotic checkpoint*, ATPase transportadora de Sódio/Potássio subunidade alfa e *putative* quinase de nucleosídeo trifosfato. Essas proteínas apresentam diversas funções.

A proteína 17H é descrita como uma proteína ligante de lipídio como Sec-14 de *Taenia* e pode ter um importante papel no tráfico de membrana, sugerindo estar envolvida na interação com o organismo hospedeiro (MONTERO et al., 2007). A mitocôndria contém seu próprio DNA mitocondrial (mtDNA), com genes para RNAs ribossomal (rRNA), RNAs transportador (tRNA), e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa como adenosina trifosfato subunidades 6 e 8, citocromo b, citocromo c oxidase subunidade 1-3 (Cox1-3) e NADH desidrogenase subunidades 1-6 e 4L (ND1-6 e 4L). O mtDNA de *T. solium* possui 36 genes para 12 proteínas, 2 rRNAs e 22 tRNAs. Entre as proteínas codificadas pelo mtDNA de *T. solium* estão a NADH desidrogenase subunidades 2 e a citocromo c oxidase subunidade I (NAKAO; SAKO; ITO, 2003).



O gene *c-jun*, juntamente com *c-fos*, está relacionado com a proliferação celular e diferenciação em *T. solium* (MORALES-MONTOR et al., 2004). Em estudo de Gauci; Lightowlers (2001) os genes TSO45 de *T. solium* apresentarem similaridade com genes codificantes de antígenos protetores para o hospedeiro de *Taenia ovis* e *T. saginata*, indicando que as proteínas codificadas de *T. solium* são possivelmente antigênicas com potencial uso como vacina nos hospedeiros intermediários deste parasito. A proteína recombinante de oncosfera de *T. solium* TSOL45-1A induziu mais de 97% de proteção em ensaios de vacinação em suínos desafiados com ovos desse parasito (KYNGDON et al., 2006).

A paramiosina, também conhecida com antígeno B, foi identificada com um antígeno candidato à vacina de helmintos, e é expressa especificamente no estágio de metacéstódeo em *T. solium* (GUO et al., 2007), sendo uma proteína muscular com importante papel na sobrevivência do parasito, inibindo a fração 1 do complemento (VARGAS-PARADA; LACLETE, 2003). Rodríguez-Contreras et al. (1998) isolou e caracterizou dois transportadores de difusão facilitada de glucose (TGTP1 e TGTP2) de *T. solium*, sendo TGTP1 abundante no tegumento do parasito adulto e do cisticerco. Recentes estudos demonstraram que filaminas não são apenas ligantes mecânicos de filamentos de actina, mas também são conectores para diversas proteínas com função de transdução e tradução de sinal. A filamina de *S. mansoni* é um antígeno interno e associado ao tegumento do parasito, com alto potencial para ser utilizado como vacina (MOHAMED et al., 2008).

A ATPase família tipo-P são enzimas membrana associadas responsáveis pelo estabelecimento e manutenção intracelular de concentração íons, usando ATP (adenina trifosfato) com força de direcionamento. ATPases transportadora de Sódio/Potássio pertencem a esta família e carregam ativamente o transporte de 3Na<sup>+</sup> (fora) e 2K<sup>+</sup> (dentro) através da membrana, gerando gradientes químicos e elétricos, requeridos para manter o potencial de descanso celular, capacidade de excitação dos miócitos e neurônios e, em alguns casos, para importação de nutrientes como glucose e aminoácidos para dentro das células. Em *T. solium*, atividade de ATPase foi encontrada na superfície do cisticerco, podendo estar relacionada à proteção do parasito contra respostas mediadas pelo complemento (WILLMS et al., 2004). Analisando as proteínas às quais os peptídeos foram similares, muitas tem potencialidade de alguma forma interferir na viabilidade do cisticerco, apontando uma potencial utilização dos peptídeos em ensaios de vacinação. E devido o fato dos peptídeos terem reconhecidos soros com NC inativa, a utilização deles como vacinas pode acelerar o processo de calcificação do metacéstódeo, diminuindo os danos ao hospedeiro.

Epítopos podem ser classificados como conformacionais (seqüências descontínuas) ou não conformacionais (seqüências lineares). Epítopos lineares são curtos estiramentos da estrutura da proteína primária, composta de resíduos contínuos de aminoácidos da seqüência primária. Epítopos conformacionais consistem em muitos resíduos de aminoácidos, discretos na seqüência primária, que montam determinantes antigênicos na forma da estrutura terciária das proteínas (Barlow; Edwards; Thornton, 1986), justificando o fato de que prováveis motivos não tenham sido encontrados na seqüência linear da proteína do capsídeo.

Em consideração a todos os dados apresentados, os resultados sugerem que os fagotopos são ferramentas úteis no diagnóstico de diferenciação de fases da NC. A distinção entre NC ativa e inativa é importante, principalmente tratando-se da escolha de tratamento dos pacientes, porque é consenso que o tratamento da NC deve ser individualizado em relação à quantidade e localização das lesões, e ao estágio evolutivo do parasito, além disso, o teste também pode ser utilizado no acompanhamento do curso da infecção (WHITE JR, 2002; GARCIA et al., 2002; DORNY et al., 2003). Dessa forma, a utilização de um teste imunodiagnóstico para acompanhamento da evolução da doença e verificação do sucesso do tratamento, que levam à calcificação dos metacestódeos, torna-se de grande validade. Pois atualmente essas verificações são usualmente realizadas com emprego dos métodos de NI, TC e RM, no entanto esses exames são caros e inacessíveis na maioria das áreas onde a NC é endêmica. A utilização dos fagotopos selecionados no ELISA para distinção das fases da NC é um teste diagnóstico economicamente viável em relação aos métodos de NI, apesar da tecnologia de alto custo, após a seleção e seqüenciamento dos fagos, eles podem ser armazenados, sendo necessário apenas sua amplificação para crescimento dos clones que serão utilizados no imunodiagnóstico, mas para tanto os equipamentos necessários são permanentes em um laboratório, como centrífugas, capela de fluxo laminar.

Esse estudo foi o primeiro a utilizar a imunização de galinhas com extrato salino de metacestódeo de *T. solium*, provando ser uma boa alternativa na produção de anticorpos específicos em curto espaço de tempo. Os clones Cc6, Cc8, Cc25, Cc27, Cc30, Cc45 e Cc48 são potenciais candidatos como marcadores de fase inativa de NC, podendo auxiliar no diagnóstico das formas de NC, principalmente nas áreas onde os estudos de neuroimagem não estão disponíveis e em estudos epidemiológicos, nos quais seria inviável a utilização dos métodos de NI devido o custo e tempo. Porém são necessários mais testes com um número maior de amostras de soro para verificar qual destes clones apresenta o melhor marcador de fase inativa de NC, e posteriormente aplicá-lo no desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido e testá-lo em ensaios de proteção.

## 6. CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver resposta imunológica em galinhas através da imunização destas com o extrato total de metacestódeos de *T. solium*, modelo animal utilizado pela primeira vez na neurocisticercose. A produção destes anticorpos policlonais IgY foi eficiente por produzir altos títulos de anticorpos, conferindo a especificidade necessária para os experimentos de *biopanning* (seleção biológica).

- 26 peptídeos foram selecionados por *phage-display* e *biopanning* utilizando anticorpos IgY anti-metacestódeo de *T. solium*, sendo estas técnicas úteis para seleção de prováveis epítomos miméticos imunorreativos de metacestódeos de *T. solium* complementares às IgYs específicas.

- Dentre os 26 clones de fagos selecionados sete apresentaram os melhores resultados no método imunoenzimático ELISA, com potencial antigênico na detecção de anticorpo IgG para o diagnóstico sorológico de fase inativa de NC e, pela característica de possível diferenciação de fases da doença, também demonstraram ter potencialidade no acompanhamento da evolução da doença podendo ser empregado como uma ferramenta de prognóstico da NC. Desta forma estes clones apresentam-se estruturalmente semelhantes aos epítomos nativos de metacestódeo de *T. solium*.

- A análise de bioinformática revelou que os peptídeos selecionados apresentaram-se determinado nível de similaridade com proteínas de *Taenia* sp. depositadas no BLAST, demonstrando que a seleção de peptídeos reativos contra anticorpos IgY anti-metacestódeos de *T. solium* foi eficaz.

- São necessários mais estudos para validação dos fagos selecionados como marcadores de fase ativa da NC, utilizando um número maior de amostras. E posteriormente, utilizá-los para desenvolvimento de um teste diagnóstico simples e acessível para NC, além de verificação do comportamento dos fagotopos em ensaios de proteção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Desenvolvimento dos linfócitos e o rearranjo e expressão dos genes dos receptores de antígenos. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2008. cap. 8, p. 153-189.
- ADDA, C. G.; ANDERS, R. F.; TILLEY, L.; FOLEY, M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2002.
- AGAPEJEV, S. Aspectos clínicos-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 3B, p.822-828, 2003.
- AHMAD, F. U.; SHARMA, B. S. Treatment of intramedullary spinal cysticercosis: report of 2 cases and review of literature. **Surgical Neurology**, v. 67, n. 1, p. 74-77, 2007.
- ALARCÓN, F. Neurocisticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. **Revista de Neurología**, v. 43, n. S1, p. S93-S100, 2006.
- ALMEIDA, C. R.; OJOPI, E. P.; NUNES, C. M.; MACHADO, L. R.; TAKAYANAGUI, O. M.; LIVRAMENTO, J. A.; ABRAHAM, R.; GATTAZ, W. F.; VAZ, A. J.; DIAS-NETO, E. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 5, p. 307-310, 2006.
- ANDRADE-FILHO, A. S.; FIGUERÔA, L. F.; ANDRADE-SOUZA, V. M. Clinical tomographic correlations of 220 patients with neurocysticercosis, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 114-117, 2007.
- ARAKAWA, H.; BUERSTEDDE, J. M. Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. **Developmental Dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 229, n. 3, p. 458-464, 2004.
- ARRUDA, G. C.; DA SILVA, A. D. T.; QUAGLIATO, E. M. A. B.; MARETTI, M. A.; ROSSI, C. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 10, n. 10, p. 1005-1012, 2005.
- AZZAZY, W.; HIGHSMITH Jr, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 425-445, 2002.

---

\*Segundo normas da ABNT, NBR15606-5

BAERMANN, G. Eine einfache methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) - larven in Erdproben. Mededeel Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K. SILVERMAN, G. J. **Phage display: a laboratory manual**. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BARBIERI, M.; FERNÁNDEZ, V.; GONZÁLEZ, G.; LUACES, V. M.; NIETO A. Diagnostic 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 hydatidosis. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 2, p. 51-61, 1998.

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

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

BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 747-748, 1986.

BENEDETI, M. R.; FALAVIGNA, D. L. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; ARAÚJO, S. M. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com neurocisticercose atendidos no hospital universitário regional de Maringá, Paraná, Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 65, n. 1, p. 124-129, 2007.

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

BENTLEY, L.; FEHRSEN, J.; JORDAAN, F.; HUISMANS, H.; DU PLESSIS, D. H. Identification of antigenic regions on VP2 of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. 4, p. 993-1000, 2000.

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

BORKOW, G.; BENTWICH, Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 17, n. 4, p. 1012–1030, 2004.

BUENO, E. C.; SNEGE, M.; VAZ, A. J.; LESER, P. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1140-1144, 2001a.

BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; AVILA, S. L.; FERREIRA, A. W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 126, n. 2, p. 304-310, 2001b.

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

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

CARABIN, H.; KRECEK, R. C.; COWAN, L. D.; MICHAEL, L.; FOYACA-SIBAT, H.; NASH, T.; WILLINGHAM, A. L. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South África. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 6, p. 906-916, 2006.

CARLANDER, D.; STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 179-189, 1998.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunology Research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000.

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

CHAVARRÍA, A.; ROGER, B.; FRAGOSO, G.; TAPIA, G.; FLEURY, A.; DUMAS, M.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 12, p. 1109-1115, 2003.

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

CHIANURA, L.; SBERNA, M.; MOIOLI, C.; VILLA, M. R.; ORCESE, C.; CAUSARANO, R. Neurocysticercosis and human immunodeficiency virus infection: a case report. **Journal of Travel Medicine**, v. 13, n. 6, p. 376-380, 2006.

CHRISTOPHER, G.; LEANN, A.; ROBIN, T.; ANDERS, F.; FOLEY, M. Isolation of peptides that mimic epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4679-4688, 1999.

HUNG, J. Y.; BAHK, Y. Y.; HUH, S.; KANG, S. Y.; KONG, Y.; CHO, S. Y. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1307-1315, 1999.

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**, v. 24, n. 6, p. 337-341, 1982.

COSTA-CRUZ, J. M.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; DE MORAES, A. T.; GUIMARÃES, A. H.; SALOMÃO, E. C.; ALCÂNTARA, T. M. Occurrence of cysticercosis in autopsies performed in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 53, n. 2, p. 227-232, 1995.

COVA, L. DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, n. Suppl 1, p. S70-S74, 2005.

DANIELS, T. L.; MOORE, T. A. Neurocysticercosis in Kansas. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 2, p. 150-152, 2006.

DAVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D.; HIDALGO-ALVAREZ, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 11, n. 6, p. 657-673, 2000.

DEGIORGIO, C.; PIETSCH-ESCUETA, S.; TSANG, V.; CORRAL-LEYVA, G.; NG, L.; MEDINA, M. T.; ASTUDILLO, S.; PADILLA, N.; LEYVA, P.; MARTINEZ, L.; NOH, J.; LEVINE, M.; DEL VILLASENOR, R.; SORVILLO, F. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 111, n. 2, p. 84-88, 2005.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocisticercosis: actualización em diagnóstico y tratamiento. **Neurologia**, v. 20, n. 8, p. 412-418, 2005.

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

DEL BRUTTO, O. H.; CASTILLO, P. R.; MENA, I.; FREIRE, A. Neurocysticercosis among patients with cerebral glioma. **Archives of neurology**, v. 54, n. 9, p. 1125-1128, 1997.

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

DEL LA GARZA, Y.; GRAVISS, E. A.; DAVER, N. G.; GAMBARIN, K. J.; SHANDERA, W. X.; SCHANTZ, P. M.; WHITE JR, A. C. Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 766-770, 2005.

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

DUA, T.; ANEJA, S. Neurocysticercosis: management issues. **Indian Pediatrics**, v. 43, n. 3, p. 227-235, 2006.

DZIEMIAN, E.; ARNOWSKA, H.; KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, M.; MACHNICKA, B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 3, p. 187-190, 2008.

ENSEÑAT, J.; MARTÍNEZ-MAÑAS, R.; HORCAJADA, J. P.; DE JUAN, C.; FERRER, E. Diagnostic and therapeutic difficulties in neurocysticercosis: presentation of 6 cases and review of the literature. **Neurocirugía**, v. 18, n. 2, p. 101-110, 2007.

ERHARD, M. H.; SCHMIDT, P.; ZINSMEISTER, P.; HOFMANN, A.; MÜNSTER, U.; KASPERS, B.; WIESMÜLLER, K. H.; BESSLER, W. G.; STANGASSINGER, M. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poultry Science**, v. 79, n. 9, p. 1264-1270, 2000.

ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A. H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O. M.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; MAIA, A. A. M.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-Kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3178-3184, 2005.



FAÇANHA, M. C. Cysticercosis' admissions in public health hospitals: Ceará State distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 484-487, 2006.

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

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

FERRER, E.; BONAY, O.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L. M.; D'AVILA, I.; CORTÉZ, M. M.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 90-100, 2007.

FLEURY A, DESSEIN A, PREUX PM, DUMAS M, TAPIA G, LARRALDE C, SCIUTTO E. Symptomatic human neurocysticercosis age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 7, p. 830-837, 2004.

FLEURY, A.; MORALES, J.; BOBES, R. J.; DUMAS, M.; YÁNEZ, O.; PIÑA, J.; CARRILLO-MEZO, R.; MARTÍNEZ, J. J.; FRAGOSO, G.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 551-558, 2006.

FLISSER, A.; RODRÍGUEZ-CANUL, R.; WILLINGHAM III, A. L. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 283-292, 2006.

FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 43-51, 2003.

FLISSER, A.; GAUCI, C. G.; ZOLI, A.; MARTINEZ-OCAÑA, J.; GARZA-RODRIGUEZ, A.; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J. L.; MARAVILLA, P.; RODRIGUEZ-CANUL, R.; AVILA, G.; AGUILAR-VEGA, L.; KYNGDON, C.; GEERTS, S.; LIGHTOWLERS, M. W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5292-5297, 2004.

GARCIA, H. H.; DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 653-661, 2005.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 411-419, 2003.

GARCIA, H. H.; EVANS, C. A. W.; NASH, T. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; WHITE JR., A. C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V. C. W.; SCHANTZ, P. M.; ALLAN, J. C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J. S.; MARTINEZ, S. M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; DEL BRUTTO, O. H. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 747-756, 2002.

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

GAZARIAN, K. G.; ROWLEY, M. J.; GAZARIAN, T.G.; SOTELO, J.; GARCÍA-MENDOZA, E.; HERNÁNDEZ, R. Post-panning computer-aided analysis of phagotope collections selected with neurocysticercosis patients polyclonal antibodies: separation of disease-relevant and irrelevant peptide sequences. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 4, n. 3, p. 221-235, 2001.

GERSHONI, J. M.; ROITBURD-BERMAN, A.; SIMAN-TOV, D. D.; TARNOVITSKI FREUND, N.; WEISS, Y. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. **BioDrugs**, v. 21, n. 3, p. 145-156, 2007.

GIMÉNEZ-ROLDÁN, S.; DÍAZ, F.; ESQUIVEL, A. Neurocysticercosis e inmigración. **Neurología**, v. 18, n. 7, p. 385-388, 2003.

GOMES, I.; VEIGA, M.; CORREA, D.; MEZA-LUCAS, A.; MATA, O.; GARCIA, R. C.; OSORNIO, A.; RABELO, R.; LUCENA, R.; MELO, A. Cysticercosis in epileptic patients of Mulungu do Morro Northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 3A, p. 621-624, 2002.

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

GONZÁLEZ, D.; VAN DER BURG, M.; GARCÍA-SANZ, R.; FENTON, J. A.; LANGERAK, A. W.; GONZÁLEZ, M.; VAN DONGEN, J. J.; SAN MIGUEL, J. F.; MORGAN, G. J. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3112-3121, 2007.

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

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**, v. 41, n. 6, p. 2577-2586, 2003.

HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; WHITFIELD, F. W.; YUSHAK, M. L.; LANE, W. S.; GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 109-117, 2006.

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

HERRERA, L. A.; BENITA, A.; SOTELO, J.; CHAVEZ, L.; OLVERA, J.; RASCON, A.; LOPEZ, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 2, p. 154-158, 1999.

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

HONJO, T.; KINOSHITA, K.; MURAMATSU, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 165-196, 2002.

HUSAIN, M.; JHA, D. K.; RASTOGI, M.; HUSAIN, N.; GUPTA, R. K. Neuro-endoscopic management of intraventricular neurocysticercosis (NCC). **Acta Neurochirurgica**, v. 149, n. 4, p. 341-346, 2007.

HUSAIN, N.; SHUKLA, N.; KUMAR, R.; HUSAIN, M.; CHATURVEDI, A.; AGARWAL D, G. G.; GUPTA, R. K. ELISA in the evaluation of therapeutic response to albendazole in neurocysticercosis. **Journal of Infection**, v. 56, n. 1, p. 65-73, 2008.

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

ISHIDA, M. M. I.; PERALTA, R. H. S.; LIVRAMENTO, J. A.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot assay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 343-346, 2006.

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**, v. 86, n. 1, p. 3-17, 2003.

KRAFT, R. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. **American Family Physician**, v. 76, n. 1, p. 91-96, 2007.

KRIEF, A.; LETESSON, J. J.; BILLEN, D. Comparison between "IgY technology" from chickens and "IgG technology" from mice for production of tailor-made antibodies. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 1843-1846, 2002.

KUROSAWAA, G.; AKAHORIA, Y.; MORITAA, M.; SUMITOMOB, M.; SATOC, N.; MURAMATSUB, C.; EGUCHIB, K.; MATSUDAB, K.; TAKASAKID, A.; TANAKAA, M.; IBAA, Y.; HAMADA-TSUTSUMIA, S.; UKAIE, Y.; SHIRAISHIE, M.; SUZUKIE, K.; KUROSAWAA, M.; FUJIYAMAF, S.; TAKAHASHIF, N.; KATOG, R.; MIZOGUCHIH, Y.; SHAMOTOI, M.; TSUDAJ, H.; SUGIURAK, M.; HATTORIL, Y.; MIYAKAWAL, S.; SHIROKIC, R.; HOSHINAGAC, K.; HAYASHID, N.; SUGIOKAL, A.; KUROSAWA, Y. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 5, n. 20, p. 7287-7292, 2008.

KYNGDON, C. T. ; GAUCI, C. G. ; GONZALEZ, A. E.; FLISSER, A.; ZOLI, A.; READ, A. J.; MARTÍNEZ-OCAÑA, J.; STRUGNELL, R. A.; LIGHTOWLERS, M. W. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 191-190, 2006.

LACLETTE, J. P.; LANDA, A.; ARCOS, L.; WILLMS, K.; DAVIS, A. E.; SHOEMAKER, C. B. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 287-295, 1991.

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

LEE, K. A.; CHANG, S. K.; LEE, Y. J.; LEE, J. H.; KOO, N. S. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 488-493, 2002.

LEVIN, A. M.; WEISS, G. A. Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display. **Molecular BioSystems**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2006.

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

LINO-JUNIOR, R. S.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. Occurrence of encephalic and cardiac cysticercosis (*Cysticercus cellulosae*) in necropsy. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 5, p. 495-498, 1999.

LINO-JUNIOR, R. S.; FALEIROS, A. C.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. Anatomopathological aspects of neurocysticercosis in autopsied patients. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 65, 1, p. 87-91, 2007.

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

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

MACHADO, G. A.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 11, p. 1369-1376, 2007.

MANDAL, J.; SINGHI, P. D.; KHANDELWAL, N.; MALLA, N. Evaluation of lower molecular mass (20–24 kDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1097-1101, 2008.

MANOUTCHARIAN, K.; DÍAZ-OREA, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.; GONZÁLEZ, E.; DE ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GÓMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 99, n. 1-2, p. 11-24, 2004.

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

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, 5, p.569-579, 2000.

MANSIKKA, A.; SANDBERG, M.; LASSILA, O.; TOIVANEN, P. Rearrangement of **immunoglobulin** light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 23, p. 9416-9420, 1990.

MAYROSE, I.; SHLOMI, T.; RUBINSTEIN, N. D.; GERSHONI, J. M.; RUPPIN, E.; SHARAN, R.; PUPKO, T. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 1, p. 69-78, 2007.

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

MOLINARI, J. L.; GARCIA-MENDOZA, E.; DE LA GARZA, Y.; RAMIREZ, J. A.; SOTELO, J.; TATO, P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 777-781, 2002.

MONTANO, S. M.; VILLARAN, M. V.; YLQUIMICHE, L.; FIGUEROA, J. J.; RODRIGUEZ, S.; BAUTISTA, C. T.; GONZALEZ, A. E.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. **Neurology**, v. 65, n. 2, p. 229-234, 2005.

MONTENEGRO, T.; GILMAN, R. H.; CASTILLO, R.; TSANG, V.; BRANDT, 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**, v. 36, n. 4, p. 327-334, 1994.

MONTERO, E.; GONZALEZ, L. M.; BONAY, P.; ROSAS, G.; HERNANDEZ, B.; SCIUTTO, E.; PARKHOUSE, R. M.; HARRISON, L. J.; MORALES, M. A.; GARATE, T. *Taenia solium*: identification and preliminary characterization of a lipid binding protein with homology to the SEC14 catalytic domain. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 191-200, 2007.

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

MORALES, J.; MARTÍNEZ, J. J.; MANOUTCHARIAN, K.; HERNÁNDEZ, M.; FLEURY, A.; GEVORKIAN, G.; ACERO, G.; BLANCAS, A.; TOLEDO, A.; CERVANTES, J.; MAZA, V.; QUET, F.; BONNABAU, H.; DE ALUJA, A. S.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. **Vaccine**, v. 26, n. 23, p. 2899-2905, 2008.

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

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

NOGALES-GAETE, J.; ARRIAGADA, C.; SALINAS, R. Treatment of neurocysticercosis: a review. **Revista Médica de Chile**, v. 134, n. 6, p. 789-796, 2006.

NOREN, K. A.; NOREN, C. J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**, v. 23, n. 2, p. 169-178, 2001.

ODASHIMA, N. S.; TAKAYANAGUI, O. M.; FIGUEIREDO, J. F. C. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 2B, p. 400-405, 2002.

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**, 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**, v. 101, n. 4, p. 1007-1013, 2007.

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

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

PAWLOWSKI, Z. S. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis. **Parasitology International**, v. 55, n. Suppl, p. S105-S109, 2006.

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

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

PERALTA, R. H.; VAZ, A. J.; PARDINI, A.; MACEDO, H. W.; MACHADO, L. R.; DE SIMONE, S. G.; PERALTA, J. M. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 83, n. 2, p. 159-168, 2002.  
PÊSSOA, S. B.; MARTINS, S. V. **Parasitologia Médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p.448-464.

PETTY, N. K.; EVANS, T. J.; FINERAN, P. C.; SALMOND, G. P. C. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 7-15, 2006.

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

PRASAD, K. N.; PRASAD, A.; GUPTA, R. K.; NATH, K.; PRADHAN, S.; TRIPATHI, M.; PANDEY, C. M. Neurocysticercosis in patients with active epilepsy from the pig farming community of Lucknow district, north India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 144-150, 2009.

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**, v. 61, n. 2, p. 198-202, 2008.

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

RAJSHEKHAR, V.; JOSHI, D. D.; DOANH, N. Q.; VAN DE, N.; XIAONONG, Z. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 53-60, 2003.

RATCLIFFE, M. J. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 1-2, p. 101-118, 2006.

RATCLIFFE, M. J.; JACOBSEN, K. A. Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development. **Seminars in Immunology**, v. 6, n. 3, 175-184, 1994.

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



ROBLES, Y.; GONZÁLEZ, E.; GOVEZENSKY, T.; MUNGLIA, M. E.; ACERO, G.; BOBES, R. J.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. **Clinical Immunology**, v. 116, n. 3, p. 265-270, 2005.

RODI, D. J.; SOARES, A. S.; MAKOWSKI, L. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 5, p. 1039-1052, 2002.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, D.; SKELLY, P. J.; LANDA, A.; SHOEMAKER, C. B.; LACLETTE, J. P. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. **Parasitology**, v. 117, n. 6, p. 579-588, 1998.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Anticorpos. In: **Imunologia**. 6ed. São Paulo: Ed Manole Ltda. 2003. cap 4, p. 65-85.

SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v. 55, n. Suppl, p. S69-S73, 2006.

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 rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1875-1890, 2000.

SCIUTTO, E.; CHAVARRIA, A.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LARRALDE, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 621-636, 2007.

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M. G.; MOLLDREM, J. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1622-1654, 2006.

SIDHU, S. S.; KOIDE, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 4, p. 481-487, 2007.

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

SILVA, M. R.M.; MAIA, A. A. M.; ESPÍNDOLA, N. M.; MACHADO, L. R.; VAZ, A. J.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 100, n. 3, p. 192-198, 2006.

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

SMITH G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p. 391-410, 1997.

SMOTHERS, J. F.; HENIKOFF, S.; CARTER, P. Affinity selection from biological libraries. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 621-622, 2002.

SOBNACH, S.; KHOSA, S. A.; PATHER, S.; LONGHURST, S.; KAHN, D.; RAUBENHEIMER, P. J. First case report of pharyngeal cysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 206-208, 2009.

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

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

STILLS JR, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 46, n. 3, p. 280-293, 2005.

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

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

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

TANG, L.; YI, X.; ZENG, X.; WANG, L.; ZHANG, S. Schistosoma japonicum: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. **Acta Biochimica et Biophysica Sínica**, v. 36, n. 3, p. 206-210, 2004.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 131, n. 3, p. 569-574, 2002.

TREVISOL-BITTENCOURT, P. C.; SILVA, N. C.; FIGUEREDO, R. Neurocisticercose em pacientes internados por epilepsia no Hospital Regional de Chapecó região oeste do Estado de Santa Catarina. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n.1, p.53-58, 1998.

TSANG, V. C.; BRAND, J. A.; BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of infectious diseases**, v. 59, n. 1, p. 50-59, 1989.

VALENÇA, M. M.; VALENÇA, L. P. Etiology of the epileptic seizures in Recife city, Brazil: study of 249 patients. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 4, p.1064-1072, 2000.

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

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M.; LIVRAMENTO, J. A.; DA SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 354-357, 1997.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392-398, 1995.

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

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

WHITE JR, A. C.; ROBINSON, P.; KUHN, R. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. **Chemical Immunology**, v. 66, p. 209-230, 1997.

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

YAKOLEFF-GREENHOUSE, V.; FLISSER, A.; SIERRA, A.; LARRALDE, C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 39-47, 1982.

YANG, W.; LAI, J.; PENG, K.; CHIANG, H.; WENG, C.; SHIUAN, D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. **Journal of Immunological Methods**, v. 304, n. 1-2, p. 15-29, 2005.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 8, p. 364-371, 2003.

ZOLI, A.; SHEY-NJILA, O.; ASSANA, E.; NGUEKAM, J.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 35-42, 2003.