

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO LUIZ ALDINUCCI BUZZO

**Caracterização imunoquímica de proteína(s) mimetizada(s) pelo peptídeo NC1
de *Taenia solium***

CURITIBA

2015

JOÃO LUIZ ALDINUCCI BUZZO

**Caracterização imunoquímica de proteína(s) mimetizada(s) pelo peptídeo NC1
em *Taenia solium***

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina no curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Ferreira de Moura

Co-orientador: Prof^o Dr^o Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido essa maravilhosa oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Por todas as pessoas maravilhosas que Ele colocou em minha vida.

À Yohana Camila Antunes Frederico pelo exemplo de dedicação, pela companhia, por todas as conversas, pela paciência de me ouvir reclamando e praguejando tantas vezes, por todo o apoio e jamais ter deixado de acreditar em mim, mas acima de tudo, por todo o respeito e por uma amizade que não pode ser explicada por palavras, seja qual for o idioma.

A toda minha família, em especial meus pais, Eliana e João, à minha irmã Ana Luiza e à minha vó Annadir, pelo amor incondicional, por me aturarem nos momentos de estresse em casa e por todo o apoio durante minha formação acadêmica.

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Juliana Ferreira de Moura, pela orientação, confiança, amizade, paciência, pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho e por sempre estar ao meu lado durante toda esta caminhada.

À Prof.^a Dr^a Larissa Magalhães Alvarenga pelas conversas, conselhos, pela companhia até tarde no laboratório e por todas as vezes em que me inflamou de boas vibrações e me encheu de entusiasmo, mesmo quando os resultados não eram tão bons.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade, pela amizade, pelo bom humor e por sentar e quebrar a cabeça comigo tantas vezes com relação aos experimentos de microscopia.

A todos os colegas de laboratório, principalmente a Rafaela Lenzi Fogaça e Alessandra Becker Finco por serem as minhas mãezonas no laboratório, por sempre terem paciência de tirar minhas dúvidas e me acompanharem quando me encontrei em necessidade.

Ao Gustavo Rossi, por todo o conhecimento que me transmitiu com relação à imunofluorescência. Sem dúvida alguma, grande parte do que aprendi com relação as técnicas de imunomarcção eu devo a ti.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal por disponibilizar o equipamentos para a realização das análises microscópicas do presente trabalho. Aos funcionários do laboratório multiusuário, Israel Henrique Bini e Lisandra Santos Ferreira-Maba por todo o conhecimento que me transmitiram com relação aos equipamentos, pelas risadas e pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrez de Ávila da Universidade do Extremo Sul Catarinense, por ter me recebido de braços abertos para a realização síntese química do peptídeo NC1.

À Bethina Steiner, aluna do Prof. Dr. Ricardo Andrez de Ávila, não somente por ter me acompanhado durante a síntese do peptídeo, mas também pela companhia e pelas boas conversas.

À Prof.^a Dr^a Célia Regina Franco, sempre cheia de energia, idéias, por ter me acompanhado durante o processamento das amostras para microscopia eletrônica, e, apesar de tantas tentivas acabarem sem sucesso, nunca ter desistido.

A todos os meus amigos, pela amizade e apoio.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Patologia Básica da UFPR pela colaboração e ajuda na execução dos experimentos.

RESUMO

A neurocisticercose (NCC) é doença neuroparasitológica mais frequente e está fortemente relacionada com diversas complicações neurológicas. A NCC ocorre quando humanos ingerem ovos de *T. solium* e os embriões liberados se alojam no sistema nervosa central. Os embriões podem formar cistos em qualquer parte do SNC, logo os sintomas de paciente para paciente variam muito, desde cegueira, meningite, hidrocefalia, convulsões e epilepsia. O grande pleomorfismo da NCC torna difícil o diagnóstico, já que este se baseia na avaliação clínica do paciente, podendo ser confundida com diversas outras complicações, e no diagnósticos por imagem, porém este só é conclusivo se o escólex do cisticerco for observado. Visando desenvolver um diagnóstico sorológico específico, sensível e de baixo custo, Hell e colaboradores (2009) selecionaram por *Phage Display* um peptídeo denominado NC1, que apresentou alta sensibilidade e especificidade. Este peptídeo foi posteriormente utilizado em um estudo realizado por Capelli-Peixoto e colaboradores (2011), visando o desenvolvimento de uma vacina. Utilizando-se do modelo animal de cisticercose em *T. crassiceps*, foi observado que o peptídeo NC1 foi capaz de gerar uma resposta protetora nos animais, reduzindo a carga parasitária em 74%. Entretanto, ainda não se tem conhecimento de qual antígeno o NC1 mimetiza, nem fora caracterizada resposta imune induzida pelo mesmo. O presente estudo teve como objetivo caracterizar por estudos de microscopia e imunológicos o antígeno mimetizado por NC1. A técnica de microscopia de fluorescência confocal foi utilizada com o objetivo de identificar a estrutura alvo de anticorpos anti-NC1 gerados em camundongos, bem como verificar sua localização celular. Utilizando-se da técnica de imunoprecipitação, o antígeno alvo foi obtido a partir do antígeno bruto de *T. crassiceps* e de *T. saginata* e depois analisado por SDS-PAGE.

Palavras-chave: Neurocisticercose (NCC), microscopia, *T. crassiceps*, NC1

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

DCM – Diclorometano

DIPC – N, N'-Diisopropilcarbodiimida

DMF – Dimetilformamida

FMOC – Fluorenil-metiloxycarbonila

HRP – *Horse Radish Peroxidase*

IF – Imunofluorescência

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

L - litros

mL – mililitros

mm – milímetros

nm – nanometros

NCC – Neurocisticercose

OPD – Ortofenilenodiamin

Overnight – Período que equivale a 12-18 horas

PBS – Tampão Fosfato Salino (*Phosphate-Buffered Saline*) pH 7,4

PFA – Paraformaldeído

SNC – Sistema nervoso central

TcCa – Antígeno bruto de *Taenia crassiceps* (*Taenia crassiceps Crude antigen*)

TsCa – Antígeno bruto de *Taenia saginata* (*Taenia saginata Crude antigen*)

WGA – *Wheat Germ Agglutinin*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO GERAL.....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.3. JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. O PARASITA.....	3
2.1.1. FORMA ADULTA.....	3
2.1.2. OVOS E ESTÁGIO LARVAL (METACESTÓDEO).....	4
2.1.3. CICLO DE VIDA.....	4
2.2. A DOENÇA.....	5
2.2.1. ASPECTOS CLÍNICOS.....	5
2.2.1.1. TENÍASE.....	5
2.2.1.2. CISTICERCOSE.....	6
2.2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.2.3. DIAGNÓSTICO.....	8
2.2.4. TRATAMENTO.....	8
2.3. NC1.....	9
2.4. ANTÍGENO HETERÓLOGO E MODELO ANIMAL.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. SORO IMUNE.....	10
3.2. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO HETERÓLOGO.....	10
3.3. COLOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	10
3.4. SÍNTESE DO PEPTÍDEO NC1.....	12

3.5. IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	13
3.6. COLORÇÃO POR PRATA.....	14
3.7. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. COLOCALIZAÇÃO DO ANTÍGENO MIMETIZADO PELO NC1 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL.....	16
4.2. IMUNOPRECIPITAÇÃO E COLORAÇÃO POR PRATA.....	23
4.3. REATIVIDADE DO SORO ANTI-NC1 FRENTE AO PEPTÍDEO NC1 RECÉM SINTETIZADO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A neurocisticercose (NCC), mesmo sendo conhecida desde a Grécia Antiga, tornou-se problema de saúde pública somente após metade do século XX, quando investigadores britânicos reconheceram a doença entre soldados retornando da Índia (GARCIA *et al.*, 2005). A NCC ocorre quando humanos ingerem ovos ou proglotes grávidas liberadas pelo verme adulto *T. solium*. Embriões são liberados pela ação do suco gástrico e fluidos intestinais, cruzam a parede do intestino, entram na corrente sanguínea e migram para o encéfalo (FLISSER, 1994; WHITE, 2000).

A NCC é considerada a doença neuroparasitológica mais frequente (FABIANI & BRUSCHI, 2013, *apud*, HAWK *et al.*, 2005) e de caráter endêmico em países em desenvolvimento, principalmente nas Américas do Sul e Central, e determinadas regiões da Ásia e da África, (NADDAF *et al.*, 2014). Entretanto, os casos em regiões não endêmicas, como América do Norte e Europa, vem aumentando devido a casos importados pela imigração (FABIANI & BRUSCHI, 2013; NADDAF *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas da doença variam, mas as mais comuns são convulsões e futura progressão para epilepsia, de fato a NCC é a principal causa do desenvolvimento de convulsões em adultos (GARCIA *et al.*, 2014). Em regiões endêmicas, a NCC está relacionada com 30% do total de casos de epilepsia (NDIMUBANZI *et al.*, 2010; NEWTON & GARCIA, 2012).

Entretanto, o diagnóstico e o tratamento ainda são falhos. O diagnóstico é baseado na avaliação clínica e estudos de imagenologia, sendo que ambos apresentam baixa especificidade. O tratamento por sua vez está baseado no uso de medicamentos ou remoção cirúrgica do parasita, sendo que ambas as abordagens apresentam grandes limitações (DEL BRUTTO, 2014).

Baseando-se nos estudos de Hell *et al.* (2009) e Capelli-Peixoto *et al.* (2011), o presente trabalho tem como objetivo identificar qual proteína estaria sendo mimetizada por esse peptídeo e o porque que esta seria um alvo para o sistema imune tanto para o diagnóstico quanto para o desenvolvimento de uma vacina. Com isso é esperado trazer novas perspectivas quanto a um diagnóstico específico, sensível e de

menor custo para o sistema público de saúde, quanto o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e/ou tratamento.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar o antígeno mimetizado pelo peptídeo NC1 por análises microscópicas, bioquímicas e imunológicas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar por ensaios de imunofluorescência (IF) a estrutura alvo dos anticorpos anti-NC1, bem como a localização celular do antígeno mimetizado pelo peptídeo NC1;
- Caracterizar por análises imunoquímicas o antígeno alvo do anticorpo anti-NC1;

1.3 JUSTIFICATIVA

A NCC é uma doença neuroparasitológica endêmica no Brasil e países em desenvolvimento, mas presente em todo o mundo. Entretanto é extremamente negligenciada, por afetar geralmente comunidades rurais ou de baixa-renda, e por seu diagnóstico difícil, e além deste fator, seu tratamento ainda é extremamente limitado devido à características da doença. Já existem estudos utilizando o peptídeo sintético NC1 para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais acessíveis e vacinas. Entretanto, ainda faz-se necessária a caracterização dos possíveis antígenos que o peptídeo NC1 mimetiza, beneficiando a elucidação dos prováveis mecanismos de ação envolvidos na imunidade induzida pelo mimotopo em questão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O PARASITA

2.1.1. FORMA ADULTA

O parasita *Taenia solium* foi primeiramente descrito por Linnaeus em 1758, quando este publicava seu trabalho descrevendo pela primeira vez todo o gênero *Taenia*. *Taenia solium* apresenta corpo achatado dividido em escólex, colo e estróbilo, e possui uma coloração branca leitosa (NEVES, 2011).

O escólex é globoso, medindo de 0,6 a 1 mm de diâmetro, situado na extremidade anterior e funciona como órgão de fixação do cestódeo à mucosa do intestino delgado humano. Apresenta quatro ventosas formadas de tecido muscular, arredondadas e proeminentes. Entre as ventosas, em posição central, encontra-se um rostelo formado por dupla fileira de acúleos, entre 25 a 50, em formato de foice (VERSTER, 1967; GARCIA *et al.*, 2003; NEVES, 2011).

O colo por sua vez é a parte mais delgada do corpo. Entretanto, as células do parênquima apresentam intensa atividade de multiplicação, promovendo o crescimento e a formação das proglotes do parasita (NEVES, 2011).

Logo após o colo encontra-se o estróbilo. Nota-se diferenciação nos tecidos, o que permite o reconhecimento de órgãos internos, ou da segmentação do estróbilo. Cada segmento formado é denominado proglote ou anel, podendo ter de 800 a 1.000 na *T. solium*, atingindo a faixa dos 2-4 metros (GARCIA *et al.*, 2005). O processo de formação dos estróbilos é progressivo, ou seja, a medida que cresce o colo, vai ocorrendo a delimitação das proglotes e cada uma delas inicia a formação dos seus órgãos. Portanto, as proglotes mais afastadas do escólex são as mais desenvolvidas. As proglotes apresentam órgãos genitais masculinos e femininos, demonstrando o parasita ser hermafrodita (NEVES, 2011; GARCIA *et al.*, 2014).

As proglotes apresentam 3 estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas. As jovens são mais curtas do que largas e já apresentam o início do desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos que se formam mais rapidamente que os femininos. A proglote madura apresenta órgãos reprodutores completos e

aptos para a fecundação. As proglotes grávidas, são mais compridas do que largas e os órgãos reprodutores sofrem involução enquanto o útero ramifica-se, ficando repleto de ovos (VERSTER, 1967; NEVES, 2011; GARCIA *et al.* 2014). A proglote grávida de *T. solium* é quadrangular, e o útero formado por 12 pares de ramificações do tipo dendrítico. Essas proglotes desprendem-se espontaneamente do estróbilo e são eliminadas passivamente com as fezes de três a seis anéis unidos (NEVES, 2011).

2.1.2.OVOS E ESTÁGIO LARVAL (METACESTÓDEO)

Os ovos de *T. solium* apresentam-se de forma esférica, medindo cerca de 30 mm de diâmetro. São constituídos por uma camada protetora denominada embrióforo. Este é formado por blocos piramidais de quitina unidos entre si por uma substância cementante conferindo resistência no ambiente. Internamente, encontra-se o embrião hexacanto ou oncosfera, provido de três pares de acúleos e dupla membrana (NEVES, 2011).

A forma larval ou metacestoda é constituída de uma vesícula translúcida com líquido claro, contendo um escólex invaginado em seu interior, com quatro ventosas, rostelo com coroa de acúleos e colo. A vesícula é composta por três membranas: a mais externa denominada de cuticular, uma intermediária ou celular e uma reticular, sendo a última a mais interna. As larvas podem atingir até 12 mm de comprimento, após quatro meses de infecção (VERSTER, 1967; NEVES, 2011).

2.1.3.CICLO DE VIDA

A *T. solium* é um cestoda que tem seu ciclo de vida restrito as áreas rurais em países em desenvolvimento. Os porcos, ao se alimentarem de fezes humanas contaminadas com ovos de *T. solium*, podem desenvolver a infecção pela larva, denominada cisticercose ou popularmente conhecida como canjiquinha no Brasil. Os humanos, por sua vez, consumindo a carne suína infectada com cisticercos e podem desenvolver a taníase intestinal, popularmente conhecida como solitária (FLISSER, 1994; GARCIA *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2014, MAHALE *et al.*, 2015).

Quando humanos alimentam-se da carne contaminada mal cozida, o escólex dos cistos evagina-se pela ação da bile e de enzimas intestinais, e se fixa na mucosa do intestino delgado. No intestino, o parasita cresce por intensa atividade mitótica no

região do colo, desenvolvendo as proglotes, que maturam quanto mais distantes do escólex. As proglotes finais são geralmente grávidas e encontram-se repleta de ovos (FLISSER, 1994; GARCIA *et al.* 2014; MAHALE *et al.*, 2015). Estes ovos são expelidos juntamente com as fezes do portador da *T. solium*. Quando ingeridos por um hospedeiro viável, geralmente o porco, os ovos chegam ao intestino, os embriões hexacantos eclodem, cruzam a parede intestinal e são levados para os demais tecidos pela circulação sanguínea onde se estabelece o estágio larval ou cisticerco. Entretanto, os humanos podem também adquirir a cisticercose via fecal-oral, podendo ser pelo consumo de alimentos contaminados com fezes (FLISSER, 1994; GARCIA *et al.* 2014; MAHALE *et al.*, 2015), ou até mesmo por auto-infecção (NASH *et al.*, 2015).

Portanto, *T. solium* tem como hospedeiros intermediário e definitivo os suínos e o ser humano, respectivamente (MAHALE *et al.*, 2015). Entretanto, o ser humano pode também ser um hospedeiro intermediário quando este consome os ovos da *T. solium* (GARCIA *et al.*, 2014; MAHALE *et al.*, 2015). Logo o ser humano pode desenvolver duas doenças diferentes contaminando-se com estágios diferentes da *T. solium*, a teníase, quando este consome a larva na carne mal cozida desenvolve a teníase, a forma adulta do parasita; e quando este consome os ovos em alimentos contaminados com fezes de outro ser humano portador do verme adulto, desenvolve a cisticercose, estágio larval do parasita.

2.2. A DOENÇA

2.2.1. ASPECTOS CLÍNICOS

2.2.1.1. TENIÁSE

A teníase ocorre somente no hospedeiro humano. As larvas evaginam no intestino delgado humano, o escólex prende-se na mucosa e se inicia a formação das proglotes. Aproximadamente 2 meses após a infecção, proglotes grávidas começam a ser liberadas e excretadas juntamente com as fezes (FLISSER, 1994; GARCIA *et al.*, 2003).

O verme prende-se fortemente à mucosa na parte mais superior do intestino delgado por meio de suas ventosas e acúleos. O parasita provoca uma inflamação leve na região de implantação (MERCHANT *et al.*, 1998) sem causar dano considerável aos tecidos (SCHANTZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2003). A teníase caracteriza-se por sintomas leves ou pode ser assintomática (SCHANTZ *et al.*, 1998). Sintomas como dores e distensão abdominal, perda de apetite e peso, náuseas e diarreia são atribuídos a infecção pelo parasita, porém não existem dados provenientes de experimentos controlados demonstrando tal associação, e a maioria dos pacientes apresentam-se livre de sintomas (FLISSER, 1994; SCHANTZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2003). Nas comunidades, os portadores da *T. solium* raramente procuram por assistência médica. Entretanto, a identificação desses pacientes é de extrema importância devido ao alto risco do desenvolvimento de cisticercose no portador, por auto-infecção, ou outros de alimentos contaminados com os ovos (GARCIA *et al.*, 2003).

2.2.1.2.CISTICERCOSE

As manifestações clínicas da cisticercose são pleiomórficas, pois estas dependem do número e da distribuição das lesões provocadas (DEL BRUTTO, 2012). As oncosferas liberadas pelos ovos devido a ação do suco gástrico e de enzimas intestinais cruzam a parede do intestino, caem na circulação sanguínea e se alojam nos vasos terminais onde se encistam, formando o cisticerco (GARCIA *at al.*, 2003, *apud*, YOSHINO, 1933).

Fora do sistema nervoso central (SNC) a cisticercose não provoca sintomas graves (GARCIA *et al.*, 2003). Quando na forma subcutânea, apresenta a formação de nódulos, geralmente nos braços e no tronco. Estes nódulos geralmente não provocam dor e com o passar de alguns meses ou anos tornam-se moles, inchados, inflamam e gradualmente desaparecem (DIXON & SMITHERS, 1934). Quando na forma muscular, apresentam-se como pequenas calcificações nos músculos dos braços e das pernas, normalmente encontrados por acidente. Se a carga parasitária for muito alta nos músculos alguns pacientes desenvolvem uma pseudohipertrofia muscular, provocando aumento dos membros do paciente. A cisticercose pode afetar os olhos, alojando-se no humor vítreo ou no espaço subretinal provocando visão embaçada, dependendo do dano à retina (GARCIA *et al.*, 2003).

A forma mais grave da cisticercose é quando a larva se encista no SNC, provocando a neurocisticercose (NCC). Nestas circunstâncias, sintomas neurológicos podem aparecer, sendo o mais comum deles, convulsões estão fortemente relacionados à posterior evolução para epilepsia (DEL BRUTTO, 2012; NASH *et al.*, 2015). Cistos viáveis provocam uma inflamação leve e são geralmente assintomáticos. Quando estes começam a se degenerar provocam respostas inflamatórias variáveis, resultando em uma ou mais convulsões (NASH *et al.*, 2015). Os cisticercos podem se alojar tanto no encéfalo, quanto na medula espinhal, nos ventrículos e nas regiões subaracnoídeas (MAHALE *et al.*, 2015). Tal variedade de áreas susceptíveis gera uma diversidade de manifestações, entre elas, hidrocefalia, meningite crônica, infartos cerebrais, ataques isquêmicos transitórios, síndrome de Bruns, demência reversível e, principalmente, convulsões com possível evolução para epilepsia (DEL BRUTTO, 2012; GARCIA *et al.*, 2014; MAHALE *et al.*, 2015, NASH *et al.*, 2015).

2.2.2.EPIDEMIOLOGIA

Apesar da existência de relatos de uma distribuição mundial da NCC, esta tem caráter endêmico apenas em países de baixa ou média renda, principalmente nas regiões das Américas Central e Sul, Ásia e África (FABIANI & BRUSCHI, 2013). Entretanto, os casos em regiões não endêmicas vem crescendo devido a imigração de pessoas das regiões endêmicas para outros países, como os Estados Unidos da América e determinadas porções da Europa (FABIANI & BRUSCHI, 2013; NADDAF *et al.*, 2014).

Estima-se que de 50 à 100 milhões de pessoas são afetadas pela cisticercose e todo mundo. Entretanto, tais valores provavelmente são subestimados já que muitos infectados não são diagnosticados. Dados da organização mundial de saúde, mostram que de 11 à 29 milhões de pessoas na América Latina são afetadas pela cisticercose (OMS, 2013). Alguns estudos sugerem que a prevalência da cisticercose no México está entre 3,1% e 3,9%. Outros estudos encontraram uma soroprevalência em áreas como Guatemala, Bolívia e Peru na faixa de 20% em humanos e 37% em suínos (YEH & SHEFFIELD, 2008).

O Brasil é considerado de média endemicidade para *T. solium*, apresentando uma queda na prevalência nas últimas décadas. Desde a década de 1980, áreas tradicionais e com alta tecnologia para a criação de suínos apresentam índices inferiores à 0,1%. Entretanto, relatos de criações artesanais apresentam valores muito superiores. Gottschalk e colaboradores (2006), em um trabalho realizado na região de Registro, no Estado de São Paulo, encontraram 20,5% de soroprevalência de cisticercose suína pelo teste ELISA em criações de fundo de quintal. Outro trabalho desenvolvido por Silva e colaboradores (2007), em abatedouro de Barbalha, Ceará, a prevalência da cisticercose em suínos provenientes de instalações rústicas foi de 4,7%, enquanto que a teníase correspondeu a 1,1% das verminoses diagnosticadas pela Secretaria de Saúde desse município. Em povoados indígenas a incidência varia de 29,4% a 64% (AGAPEJEV, 2003)

2.2.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da NCC ainda baseia-se na avaliação clínica do paciente e técnicas de imagem. A avaliação clínica é extremamente imprecisa já que a NCC apresenta uma grande variedade de sintomas dependendo da localização e quantidade de cisticercos (DEL BRUTTO, 2012; GARCIA *et al.*, 2014; NASH *et al.*, 2015).

As técnicas de tomografias computadorizadas e ressonância magnética contribuem para assegurar um diagnóstico mais preciso. Entretanto, estas ainda apresentam dificuldades, já que as lesões provocadas pelos cisticercos possuem grande semelhança com outras complicações, como tumores, granulomas micóticos, neurotuberculose, hidatidose, neurotoxoplasmose, entre outros (GARCIA *et al.*, 2014; NASH *et al.*, 2015). O diagnóstico da NCC de fato só é confirmado através de biópsia, ou se observado o escólex do cisticerco nas técnicas de neuroimagem, ou cisticercos alojados na retina do paciente (DEL BRUTTO, 2012; MAHALE *et al.*, 2015).

2.2.4. TRATAMENTO

As estratégias de tratamento para a NCC são baseadas em drogas antiparasitárias, precisamente os fármacos albendazol e praziquantel; ou a remoção cirúrgica dos cistos (GARCIA *et al.*, 2005; DEL BRUTTO, 2014; NASH *et al.*, 2015). Ambas as estratégias apresentam desvantagens, devido principalmente ao pleomorfismo da doença. Os tratamentos com albendazol e praziquantel podem levar

a reações inflamatórias indesejáveis, são incapazes de afetar o cisticerco dependendo de onde este se alojou, entre outros (DEL BRUTTO, 2014). A remoção cirurgica também é bastante limitada já que a localização do cisticerco pode tornar o procedimento inviável (MAHALE *et al.*, 2015.)

2.3. NC1

Tendo em vista as dificuldades no diagnóstico, como baixa precisão e sensibilidade, Hell e colaboradores (2009) propuseram um teste sorológico utilizando um peptídeo sintético. O grupo empregou a tecnologia de *Phage Display* na identificação de uma sequência de aminoácidos, denominada NC1 (SKSSITITNKRLTRK), capaz de identificar pacientes com NCC através de um ELISA indireto. Depois de síntese química, o peptídeo NC1 (SKSSITITNKRLTRK), mesmo sendo um mimotopo de *T. solium*, conseguiu induzir uma resposta humoral em camundongos cujos anticorpos reconheceram proteínas da região do escólex do cisticerco na imuno-histoquímica. O teste de ELISA proposto apresentou resultados promissores, como alta sensibilidade (93%) e especificidade (94,3%).

A aplicabilidade do peptídeo NC1 ainda foi explorada além dos testes sorológicos. Visando o desenvolvimento de uma vacina, Capelli-Peixoto e colaboradores (2011), utilizaram o peptídeo NC1 na imunização de camundongos infectados por cisticercos de *Taenia crassiceps* e obtiveram resultados promissores. Os camundongos apresentaram redução na carga parasitária em 74% devido a imunização com o peptídeo sintético. Tais resultados não somente comprovam a presença de antígenos em comum entre *T. crassiceps* e *T. solium*, mas que a utilização de peptídeos sintéticos tem grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e/ou prevenção.

2.4. ANTÍGENO HETERÓLOGO E MODELO ANIMAL

O modelo de cisticercose murina por *Taenia crassiceps* é o método usualmente utilizado para estudos imunológicos e bioquímicos sobre a cisticercose. As vantagens para a escolha de tal modelo devem-se a facilidade do manuseio dos camundongos, fácil e rápida contagem da carga parasitária, bem como são uma excelente fonte de antígeno heterólogo para estudos relacionados a *T. solium*, já que ambos os parasitas apresentam antígenos muito semelhantes (PERALTA *et al.*,

2010). Determinados grupos já apresentam estudos envolvendo a utilização de antígeno heterólogo advindo de *T. crassiceps* no desenvolvimento de testes de ELISA para o diagnóstico de pacientes com NCC (MINOZZO *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SORO IMUNE

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho são soros advindos de camundongos imunizados contra o peptídeo NC1 acoplado a BSA, somente BSA, ou TcCa, obtidos pelo trabalho de Capelli-Peixoto e colaboradores (2011).

3.2 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO

O antígeno bruto de *Taenia crassiceps* foi obtido conforme descrito em Vaz *et al.*, (1997) com passagem intraperitoneal do cisticercos em camundongos e foi realizado por nosso colaborador Dr. João Carlos Minozzo do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara, PR.

Cisticercos de *T. saginata* foram obtidos em abatedouros da região metropolitana de Curitiba, cujos escólex são retirados da cápsula envoltória, mantidos em PBS 0,05 M contendo inibidor de protease, sonificados (5 ciclos, 40 Hz, 10 s) e centrifugados (7500 g, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi então dosado pelo método de Bradford quanto à quantidade de proteína, aliquotado e congelado à -20°C.

3.3 COLOCALIZAÇÃO CELULAR POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cisticercos de *T. crassiceps* da sepa ORF foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). As amostras foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas em paraformaldeído (PFA) 2% por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas em PBS e armazenadas em PFA 0,5% à 4°C.

Para a imunomarcção, os cisticercos foram utilizados inteiros ou emblocados em Tissue-Tek OCT (Sakura) e posteriormente levados ao criostato (Leica CM 1850) para o preparo de lâminas histológicas, com cortes na espessura de 7 µm.

Os cisticercos inteiros foram lavados duas vezes (PBS, Saponina 0,1%), os radicais aldeídicos bloqueados utilizando solução de PBS contendo Saponina à 0,1% e Glicina 0,1 M por durante 20 minutos, e então novamente lavados duas vezes.

Os cisticercos foram incubados por 2 horas em solução de bloqueio (PBS; Saponina 0,1%; Caseína 2%; anticorpo caprino anti-IgG murina conjugado a HRP) e posteriormente incubados com soro murino anti-NC1, anti-BSA ou anti-TcCa diluídos 1:200 em solução de PBS contendo Saponina 0,1% e Caseína 2%; *overnight* (12 horas) à 4°C. Para verificar autofluorescência, foram preparados controles onde a incubação foi realizada somente com PBS contendo Saponina 0,1% e Caseína 2%.

Após a incubação com anticorpo primário, os cisticercos foram lavados e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG murina conjugada a fluoresceína (SIGMA), ou Alexa Fluor 488, ou Alexa Fluor 633, na concentração de 1 µg/mL. Para a visualização dos núcleos foi feita contramarcação com DAPI (Invitrogen) na concentração de 1 ng/mL por 40 minutos. Os cisticercos foram lavados somente em PBS e encaminhados para microscopia de fluorescência confocal.

Para as lâminas histológicas foi realizado o seguinte procedimento. Primeiramente as lâminas foram lavadas em PBS gelado, secadas por 30 min à 37°C e refixadas em PFA 2% por 1 hora. Foi realizada nova lavagem com PBS com à Saponina 0,01% e os radicais aldeídicos foram bloqueados utilizando em solução de PBS contendo Saponina 0,01% e Glicina 0,1 M por durante 5 minutos, e então novamente lavados. A partir deste ponto todas as lavagens foram realizadas com PBS contendo Saponina 0,01%.

O material foi incubado por 2 horas em solução de bloqueio (Saponina 0,01% e Caseína 2% em PBS) e posteriormente incubado com soro murino anti-NC1, anti-BSA ou anti-TcCa diluídos 1:200 em solução de bloqueio contendo BSA 2%; *overnight* à 4°C. Para verificar autofluorescência, foram preparados controles onde a incubação foi realizada somente com solução de bloqueio.

Após a incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG murina conjugada a fluoresceína (SIGMA) na concentração de 1 µg/mL. Para a visualização dos núcleos foi feita contramarcação com DAPI (Invitrogen) na concentração de 1 ng/mL por 40

minutos. As lâminas foram lavadas somente em PBS, montadas utilizando Fluoromount G (EMS) e encaminhadas para microscopia de fluorescência confocal.

As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal multifóton, modelo A1R MP+, marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan) utilizando objetiva de 20x e 60x com aberturas numéricas de 0.75 e 1.4, respectivamente. Para excitação serão utilizados os lasers 405 nm, 488 nm e 639 nm; para emissão serão utilizados os filtros de intervalo (“band pass”) entre 450/50 (425-475), 525/50 (500-550) e 700/75 (663-738).

3.4 SÍNTESE DO PEPTÍDEO NC1

Para a síntese do peptídeo foi utilizado o método desenvolvido por Merrifield, 1969 que consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal.

Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento FMOC (fluorenil-metiloxicarbonila), sua cadeia lateral também está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas. O suporte sólido insolúvel normalmente é uma resina que também se encontra protegida pelo FMOC, nesse caso utilizou-se resina Rink Amide.

Resumidamente, o tubo de síntese contendo a resina foi lavado 3 vezes com 5 mL de DMF (dimetilformamida) e em seguida foi adicionada piperidina 20%, deixando sob agitação por 20 minutos para eliminar o FMOC da resina. Após novas 3 lavagens com DMF e uma com DCM (diclorometano), foi realizado o teste do azul de bromofenol, adicionando-se uma solução de azul de bromofenol 10 mg/L em DMF à uma pequena amostra de resina, essa por sua vez irá apresentar uma coloração azul ou amarela, indicando que o grupo amina está desprotegido ou ainda protegido pelo FMOC, respectivamente.

Confirmado que o grupo amina está desprotegido, prosseguiu-se para a etapa de acoplamento, caso contrário, repetiu-se a etapa de desproteção. Nesta etapa, o primeiro aminoácido (325 μ M) a ser acoplado foi adicionado junto com os ativadores da sua função carboxila, a K-Oxyma (325 μ M) e o DIPC (325 μ M) e deixado por 30

minutos sob agitação. Após acoplamento, duas lavagens com DMF intercaladas por duas lavagens em metanol foram realizadas e novo teste do azul de bromofenol foi feito. Observada a coloração amarela, indicando que um novo aminoácido foi adicionado ao peptídeo, prosseguiu-se para nova etapa de desproteção.

Nesta etapa o grupamento FMOC do aminoácido acoplado foi removido com a presença de piperidina 20%, por 20 minutos. Ao final desta etapa, novas 3 lavagens com DMF foram realizadas e o protocolo de acoplamento do segundo aminoácido foi reiniciado. Este ciclo de acoplamento/desproteção é feito até que todos os aminoácidos do peptídeo a ser sintetizado estejam acoplados.

Após o término do último ciclo, o peptídeo já sem o grupamento FMOC do último aminoácido então foi removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa também se eliminam os grupamentos protetores da cadeia lateral. Para isto, o peptídeo foi incubado por 3 horas com uma solução de clivagem de TFA (ácido trifluoroacético) contendo 2,5% de EDT (etanoditiol - Fluka); 2,5% de água destilada e 2,5% de TES (trietilsilano - Fluka). Em seguida a solução foi filtrada e foi precipitada com éter etílico gelado obtendo assim o peptídeo. Após centrifugação o éter foi eliminado e o peptídeo ressuspendido em água mili-Q e liofilizado.

3.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Todos os processos foram realizados em tampão de imunoprecipitação não desnaturante (PBS – EDTA 5 mM). Antígeno bruto de *Taenia crassiceps* (TcCa) e o antígeno bruto de *Taenia saginata* (TsCa) foram primeiramente submetidos à uma etapa de pré-clearing. Esta etapa consiste em incubar o antígeno com um anticorpo irrelevante à fim de eliminar as proteínas que se ligam inespecificamente.

Brevemente, 1 mL de TcCa ou TsCa, ambos na concentração de 2 mg/mL, foram incubados por 1 hora, à temperatura ambiente, com 25 µL de soro murino anti-BSA e 100 µg *beads* ligadas à proteína G (GE Life Sciences). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (10000 x g, 10 min, 4°C) e o pellet descartado enquanto o sobrenadante seguiu para imunoprecipitação.

Para a imunoprecipitação em si, 500 µL de TcCa/TsCa, provenientes do pré-clearing, foram incubados com 25 µL de soro murino anti-NC1 ou IgG murina

irrelevante por 1 hora. Após a incubação foram adicionadas 100 µg de *beads* de sepharose ligadas as proteínas G (GE Life Sciences) e deixado sob agitação rotativa *overnight*. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 10000g, por 10 min, à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado em tampão de amostra (SDS 4%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0,004%; 0,125 M Tris HCl), fervido à 95-100°C por 5 minutos para separar as proteínas das *beads*, centrifugado (10000g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante recuperado e armazenado à -20°C para posterior análise de SDS-PAGE.

3.6 COLORAÇÃO POR PRATA

O material obtido por imunoprecipitação foi submetido à corrida em géis de SDS-PAGE 15%. O tampão de migração (Tris 0,025 mol/L; glicina 0,2 mol/L; SDS 0,5%, pH 8.3) foi preparado e colocado em cuba de eletroforese para homogeneização, mantendo-se a temperatura de 10°C.

Para a corrida cada poço foi carregado com 20 µg de TcCa, TsCa e o material proveniente das imunoprecipitações. A migração foi realizada à 150V até o azul de bromofenol atingir o final do gel e então encaminhados para serem corados com nitrato de prata.

Primeiramente os géis foram lavados por 5 minutos em água destilada e então passaram por duas etapas de fixação, a primeira consistindo de três banhos de 30 minutos em etanol 40% e ácido acético 10% em água destilada; e a segunda de um banho de 10 minutos em etanol 20%.

Os géis foram então lavados em água destilada por 10 minutos e sensibilizados por um minuto em solução de ditionito de sódio 0,3 g/L em água destilada.

Posteriormente, os géis foram brevemente lavados em água destilada e então corados com nitrato de prata à 2 g/L em água destilada por 40 minutos, protegido da luz.

Passada a incubação com a solução de nitrato de prata, os géis foram lavados e revelados em solução contendo carbonato de potássio 30 g/L, tiosulfato de sódio 10 mg/L e formaldeído 250 µg/L.

A reação foi interrompida quando as bandas tornaram-se visíveis utilizando solução contendo 40 g/L Tris e ácido acético à 2%.

Os géis foram então armazenados em solução de armazenamento (etanol 20%; glicerol 1,5% em água destilada) e posteriormente escaneados.

3.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Placas de 96 poços foram sensibilizadas peptídeo NC1, BSA, TcCa, TsCa ou peptídeo NC1 recém sintetizado, na concentração de 5 µg/mL, em *coating buffer* (Na₂CO₃ 12,5 mM; NaHCO₃ 75 mM) e incubadas *overnight*, à 4°C.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (NaCl 9g/L; Tween 20 0,05%) e os sítios de ligação livres bloqueados com solução de bloqueio (Caseína 2% em PBS), deixando-se incubar por 1 hora à 37°C.

Posteriormente, foram realizadas 4 novas lavagens e foi feita incubação com o anticorpo primário (anti-NC1, anti-BSA ou anti-TcCa) murino proveniente dos animais imunizados. Os soros foram diluídos em tampão de incubação (Caseína 0,125%; Tween 20 0,005%) na proporção 1:400 e foi feita incubação por 1 hora à 37°C.

Após incubação com o anticorpo primário, foram realizadas 4 novas lavagens e é feita nova incubação com anticorpo secundário (anticorpo caprino anti-IgG murina acoplado a HRP) por 1 hora à 37°C na diluição 1:3000 em tampão de incubação, como recomendado pelo fabricante.

Para a revelação, é feita nova etapa de lavagem e é adicionado tampão citrato pH 5,0 contendo peróxido de hidrogênio 0,002% e OPD 0,2 g/L. A reação ocorre ao abrigo da luz, por 20 minutos. Após 20 minutos de incubação, a reação é interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA TITERTEK Multiscan MCC/340P versão 2.20, a 492nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.COLOCALIZAÇÃO DO ANTÍGENO MIMETIZADO PELO NC1 POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL

Tendo em vista o objetivo de estabelecer a localização celular do antígeno mimetizado pelo peptídeo NC1, foram realizados experimentos de imunofluorescência onde foram utilizado soro imune anti-NC1, anti-BSA, ou anti-TcCa como anticorpo primário, bem como dupla marcação com lectina *WGA*. Foi utilizada a lectina *WGA* como marcação secundária, pois, o padrão de marcação observado no trabalho de Capelli-Peixoto e colaboradores (2011), sugere que o antígeno encontra-se na superfície celular, mais precisamente o glicocálice.

Primeiramente, foram utilizados somente cisticercos inteiros para visualização no microscópio de fluorescência confocal. Foi realizada análise utilizando o modo de detecção espectral. No experimento em questão foram utilizados os lasers nos comprimentos de onda 405 nm, 457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm e 639 nm.

Assim foi possível visualizar a presença de altos níveis de auto-fluorescência nos cisticercos, como observado na figura 1. Para verificar se os cisticercos eram realmente auto-fluorescentes, cisticercos foram submetidos as mesmas etapas de lavagem, bloqueio e incubação, porém sem a adição dos anticorpos primário e secundário, nem de DAPI. Como pode-se observar na figura 2, os cisticercos não apresentam níveis consideráveis de auto-fluorescência. O sinal observado na figura 1 pode ser resultado de ligações inespecíficas do anticorpo secundário e/ou problemas na permeabilização.

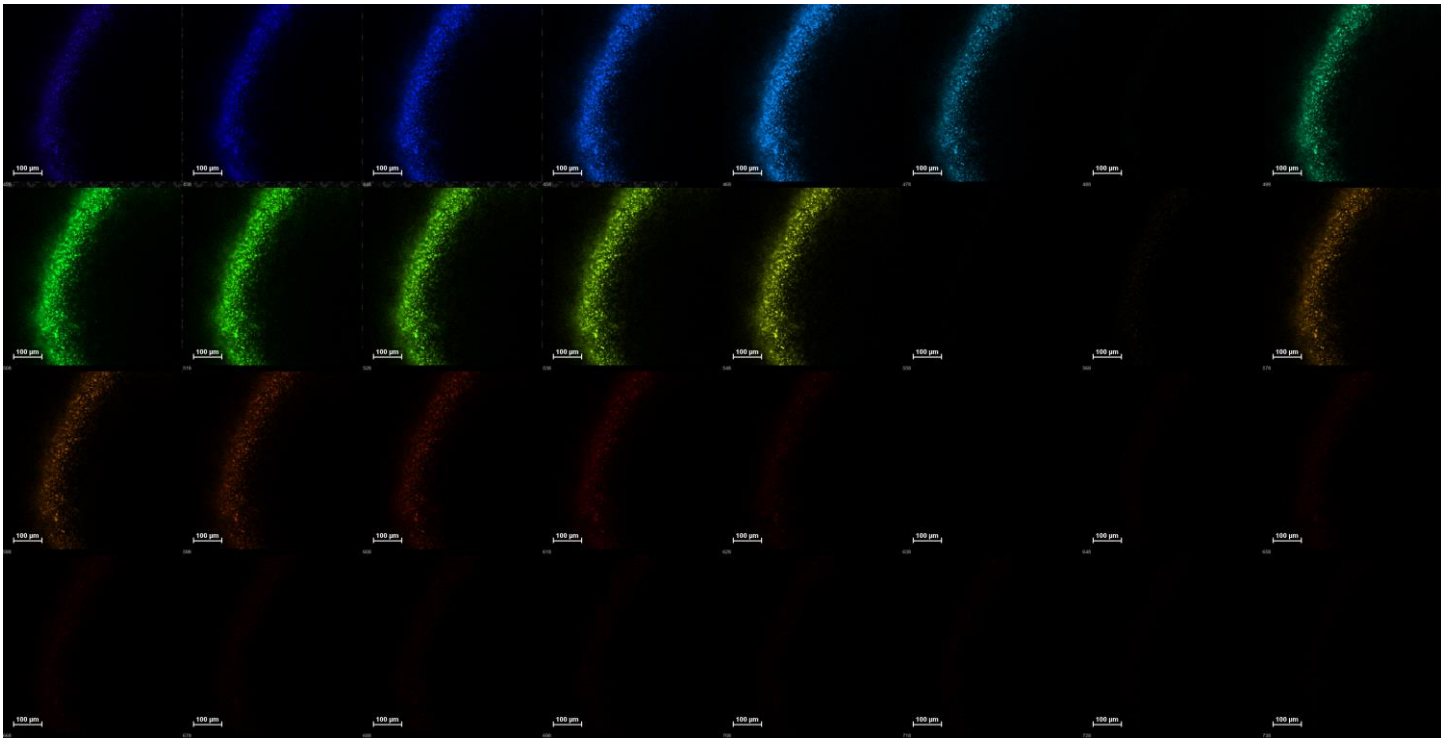


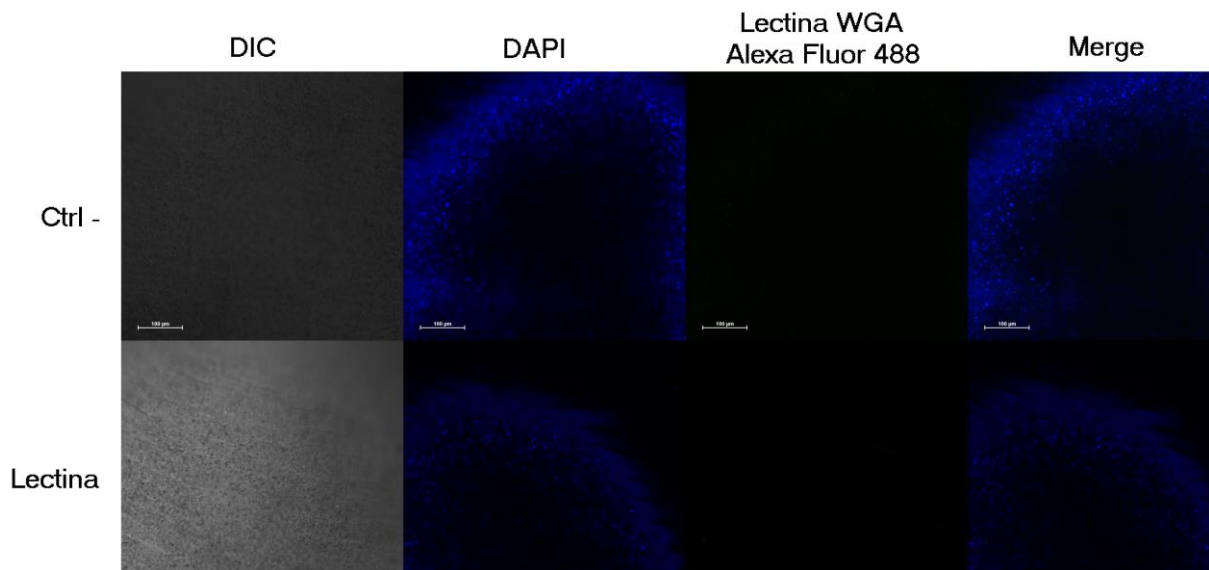
FIGURA 1 - Análise por microscopia confocal, modo de detecção espectral. Os cisticercos foram marcados com DAPI para visualização dos núcleos e anti-mouse IgG acoplada à Alexa Fluor 633. Observar a presença de fluorescência em quase todos os canais, com exceção de apenas alguns intervalos, como X e Y e na faixa do vermelho distante.



FIGURA 2 - Análise por microscopia confocal, modo de detecção espectral. Cisticercos passaram pelas mesmas etapas de lavagem e incubação, entretanto, não foi realizada marcação com DAPI, nem com anticorpo secundário. Nota-se que o cisticercos praticamente não apresenta autofluorescência como havia sido hipotetizado anteriormente. Tal resultado sugere problemas técnicos, como bloqueio e permeabilização ineficientes, no protocolo utilizado no primeiro experimento.

Procurando diminuir ruído devido a interações inespecíficas, novas amostras foram processadas, porém, com etapas de lavagem e bloqueio mais demoradas, 20

minutos e 2 horas, respectivamente. O novo protocolo foi capaz de reduzir o sinal indesejado. Entretanto, ainda foi observado que o anticorpo secundário liga-se ao cisticerco de maneira inespecífica (Figura 4), bem como a lectina *WGA* foi incapaz de ligar-se á amostra (Figura 3), sugerindo que o tegumento do cisticerco é pobre em *N*-acetilglucosaminas. Além disso, foi possível observar no cisticerco incubado somente com o anticorpo secundário, uma marcação bastante intensa nos brotamentos do cisticerco. A partir destes dados, foi hipotetizado que a superfície do cisticerco está coberta por IgGs endógenas dos camundongos nos quais estes foram cultivados.



*FIGURA 3 - Cisticercos marcados com Lectina WGA acoplada à Alexa Fluor 488 e DAPI para visualização dos núcleos. Observa-se ausência de sinal no canal de fluorescência do Alexa Fluor 488 tanto no controle negativo quanto no cisticerco tratado, sugerindo que a lectina não foi capaz de reconhecer o glicocálice do cisticerco. Apesar do resultado negativo, a ausência de marcação sugere que o tegumento do cisticerco é pobre em *N*-acetilglucosaminas.*

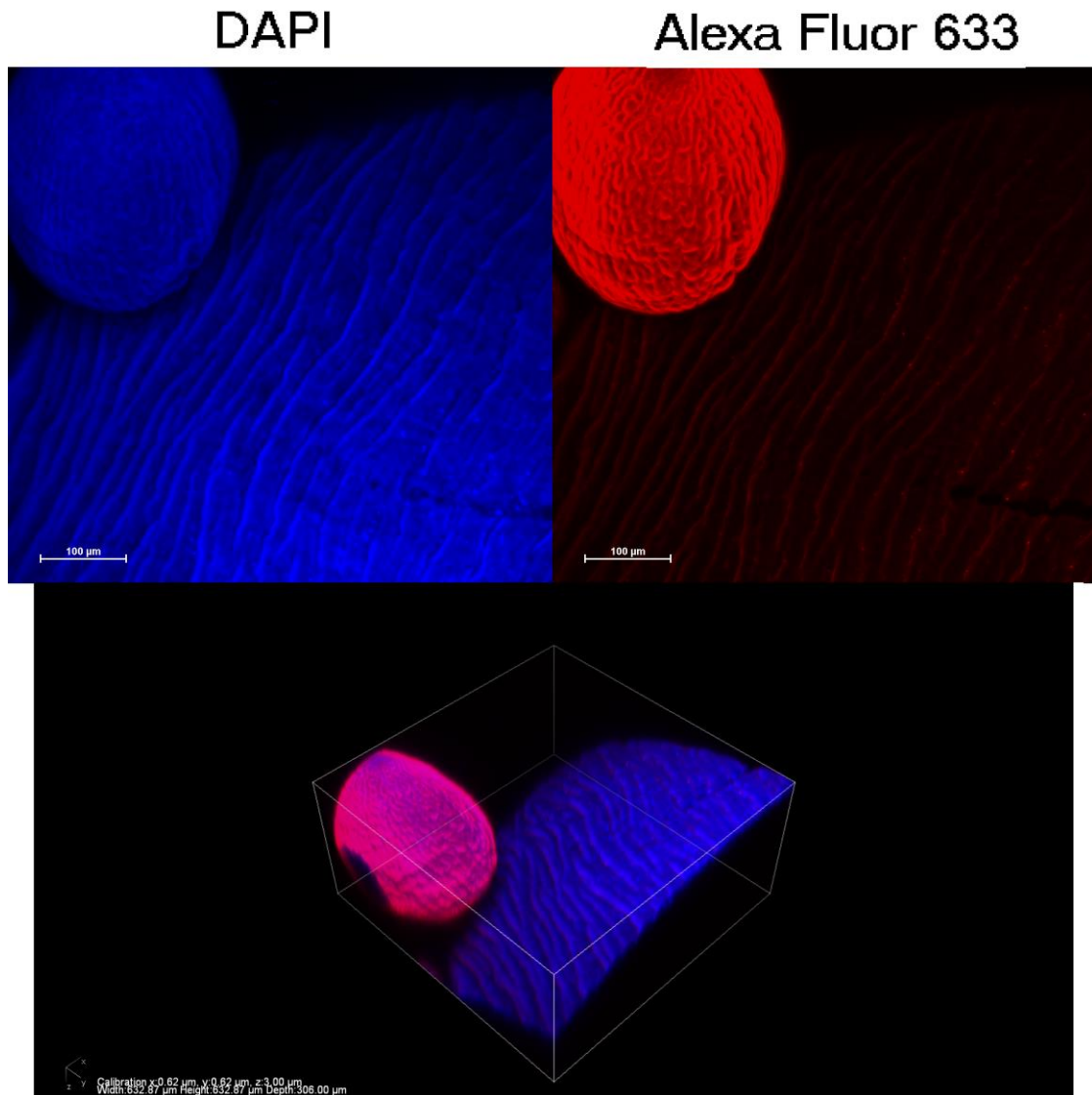


FIGURA 4 – Cisticercos tratados apenas com anticorpo secundário. Observa-se marcação tanto no cisticercos senescente quanto no brotamento, entretanto, nota-se marcação muito mais intensa no cisticercos a se formar.

Acreditando que os cisticercos estavam então cobertos de IgGs endógenas dos hospedeiros, o protocolo de marcação foi adaptado novamente, desta vez diluindo na proporção 1:300 de anticorpo caprino anti-IgG murina conjugado à HRP, na possibilidade deste bloquear os sítios de ligação nas IgGs indesejadas. Contudo, tal abordagem não foi capaz de impedir a ligação inespecífica do anticorpo secundário às teoretizadas IgGs endógenas como pode ser observado na Figura 5.

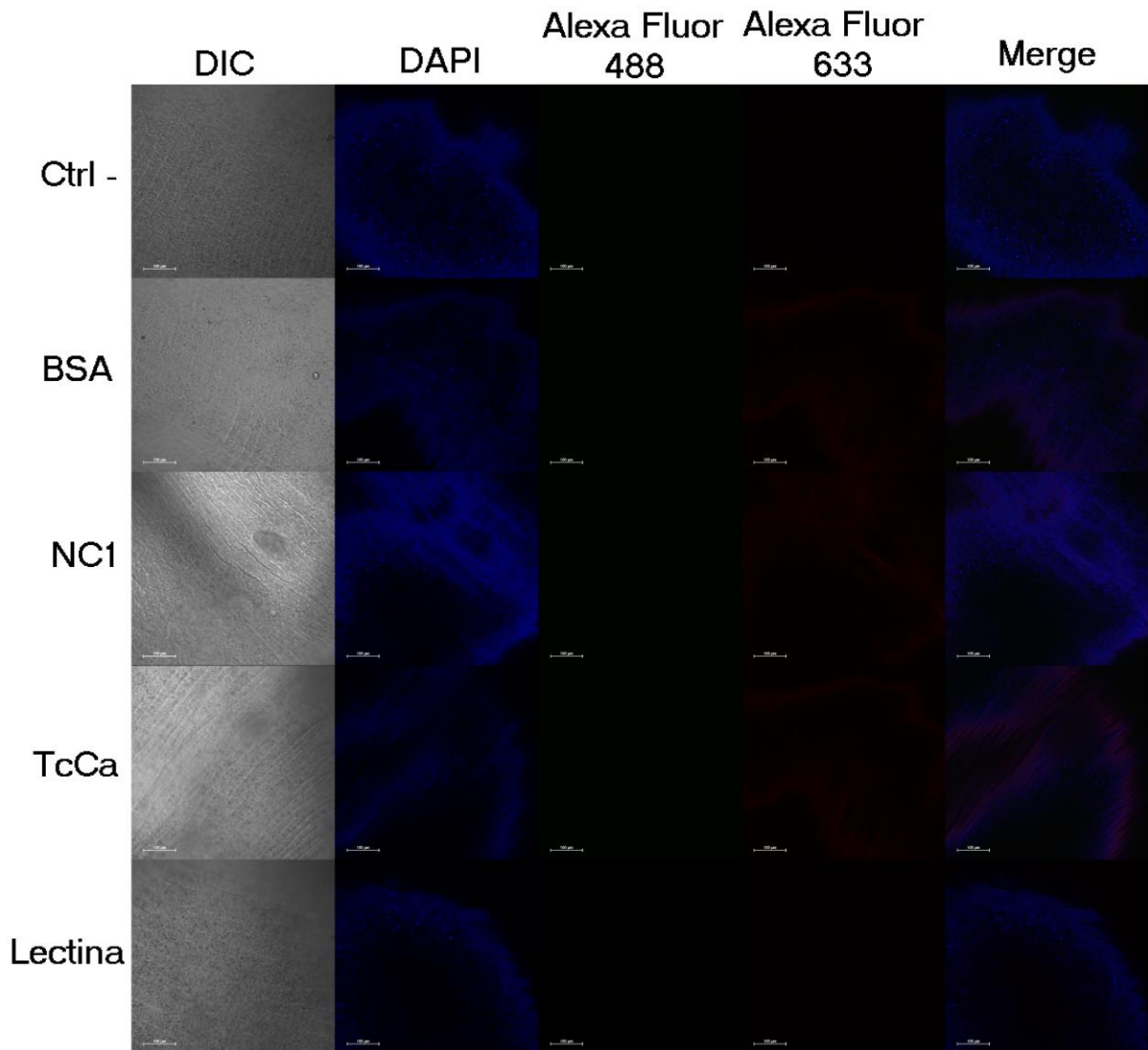


FIGURA 5 - Cisticercos submetidos à etapa de bloqueio contendo anti-mouse IgG acoplada à HRP. Como foi de esperado, o controle negativo não apresentou fluorescência no comprimento de onda do fluoróforo utilizado. Entretanto, nota-se que todos os cisticercos incubados com anticorpo primário, independente deste ser anti-BSA, anti-NC1 ou anti-TcCa, apresentaram o mesmo padrão de marcação, demonstrando intensa reatividade inespecífica.

Tendo em vista que a estratégia da utilização de anticorpos anti-IgG murina não foram capazes de bloquear a reação inespecífica do secundário, foi proposto que a molécula fluoresceste conjugada ao anticorpo secundário era a responsável pela ligação inespecífica no cisticerco. Visando testar esta hipótese, foram realizados dois novos testes, um utilizado outro anticorpo secundário, desta vez conjugado á molécula fluorescente Texas Red (Figura 6), e um segundo onde o cisticerco foi incubado com anticorpo murino anti-IgG caprina conjugado à Alexa Fluor 488 (Figura 7). Novamente, não foi possível eliminar a ligação inespecífica do secundário ao cisticerco, o que invalida a hipótese de que a molécula fluorescente era a responsável pelas interações inespecíficas.

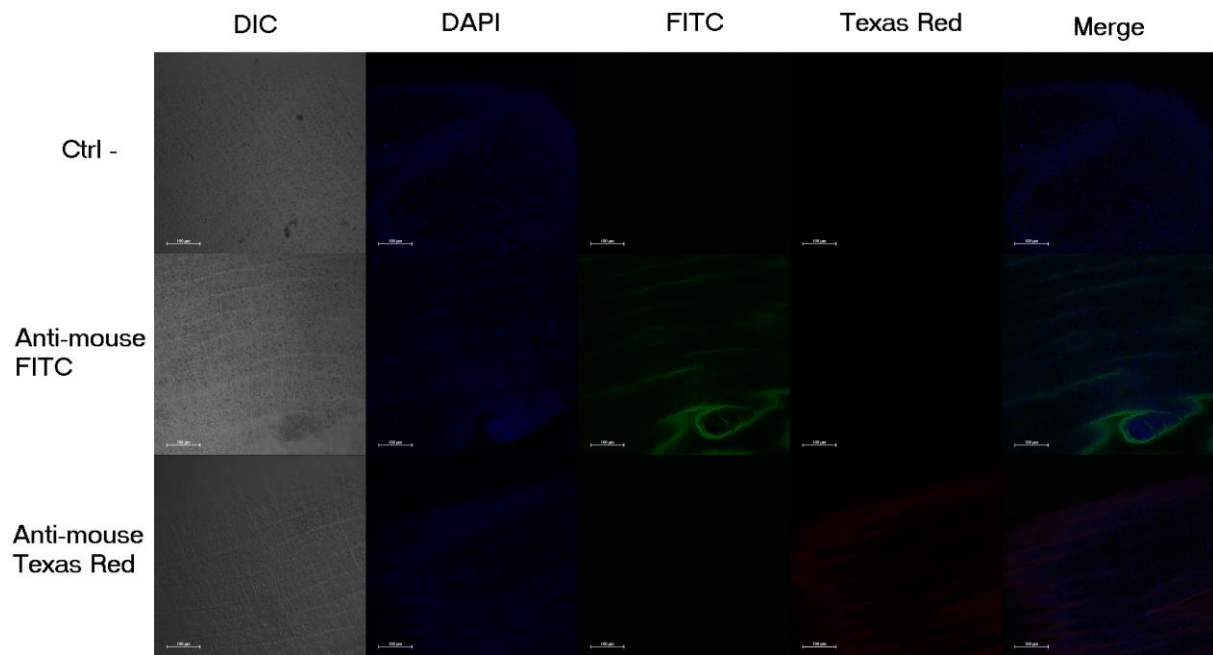


FIGURA 6 - *Cisticercos* marcados com secundário acoplado à FITC ou Texas Red. Como esperado, não é observada fluorescência no controle negativo, porém, ambos os *cisticercos* tratados com anticorpos secundários, seja conjugado à FITC ou Texas Red, apresentaram reatividade inespecífica, cada um seu respectivo canal. O resultado obtido descarta a hipótese de que a molécula fluorescente conjugada ao anticorpo apresentaria alguma espécie de afinidade ao *cisticercos*.

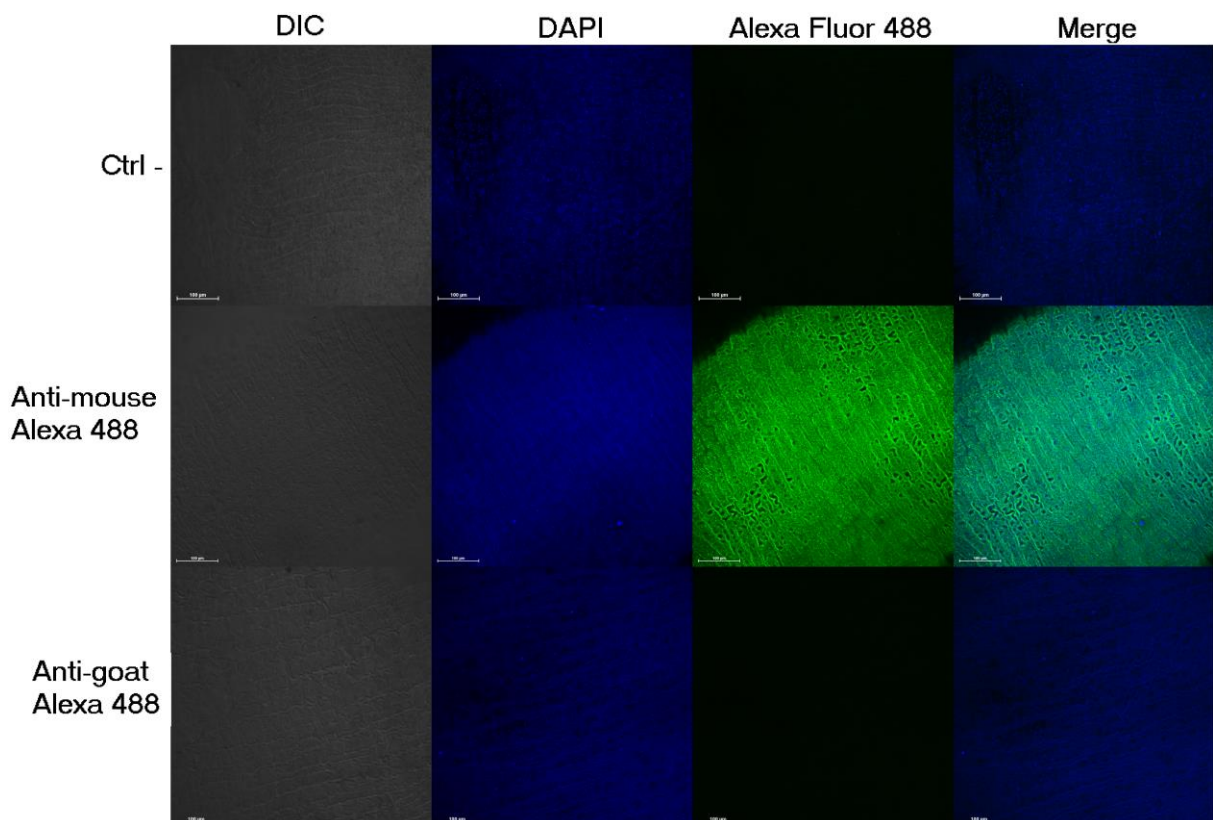


FIGURA 7 - *Cisticercos* tratados com anticorpo secundário caprino anti-IgG murina e anticorpo murino anti-IgG caprina, ambas acopladas à Alexa Fluor 488. É possível observar a presença de reatividade inespecífica bem intensa no *cisticercos* tratado com anticorpo caprino anti-IgG murina, entretanto, não é observado marcação no *cisticercos* tratado com anticorpo murino anti-IgG caprina. O resultado reforça a hipótese da presença de IgGs endógenas presentes na superfície do *cisticercos* e descarta a hipótese das moléculas fluorescentes apresentarem afinidade pelo *cisticercos*.

Com as estratégias anteriores tendo falhado, a abordagem seguinte foi de, ao invés de realizar as marcações nos cisticercos inteiros, emblocar cisticercos de *Taenia crassiceps* em Tissue-Tek O.C.T. e fazer o preparo de lâminas histológicas utilizando-se do criostato. Esta abordagem foi escolhida á fim de reproduzir os resultados obtidos por Capelli-Peixoto *et al.*, 2011.

As lâminas montadas, primeiramente apresentaram um padrão de marcação semelhante tanto para o as lâminas tratadas com soro anti-BSA, como tratadas com anti-NC1 (Figura 8). Logo, não foi possível distinguir se as marcações eram devido a anticorpos anti-BSA ou anti-NC1, já que o peptídeo NC1 fora carreado a BSA na imunização dos animais. Entretanto, foi possível eliminar o sinal do BSA ao diluir o anticorpo primário em uma solução de bloqueio contendo BSA 2%, como demonstrado na Figura 9.

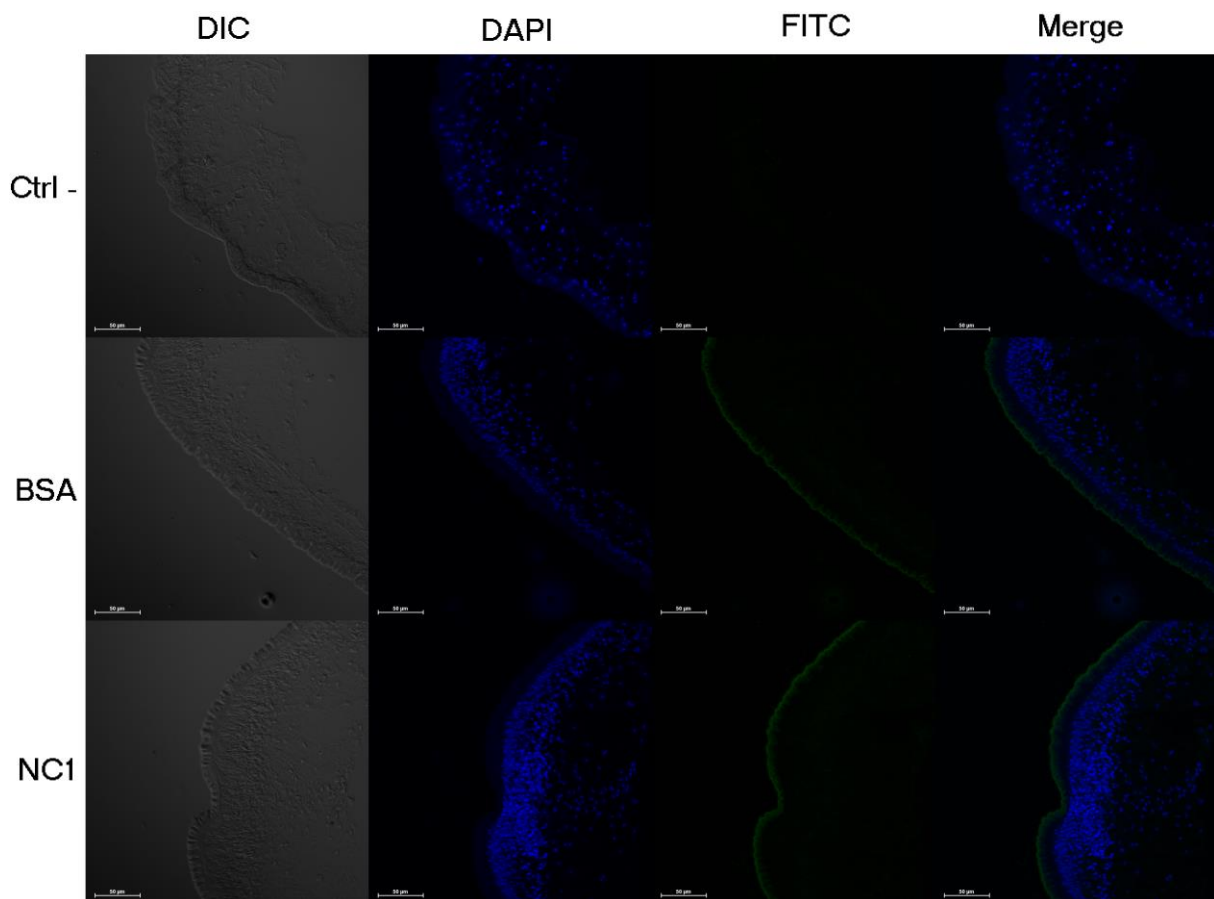


FIGURA 8 – Corte histológico dos cisticercos de *Taenia crassiceps*. O controle negativo (Ctrl -) foi incubado com anticorpo secundário, para observar reações inespecíficas, entretanto, não é detectado nenhum sinal. Porém, é possível observar que tanto o soro anti-BSA quanto o soro anti-NC1 são capazes de reconhecer o tegumento do cisticerco, apresentando até mesmo padrão de marcação, tornando impossível a verificar se existe marcação específica por anticorpos anti-NC1.

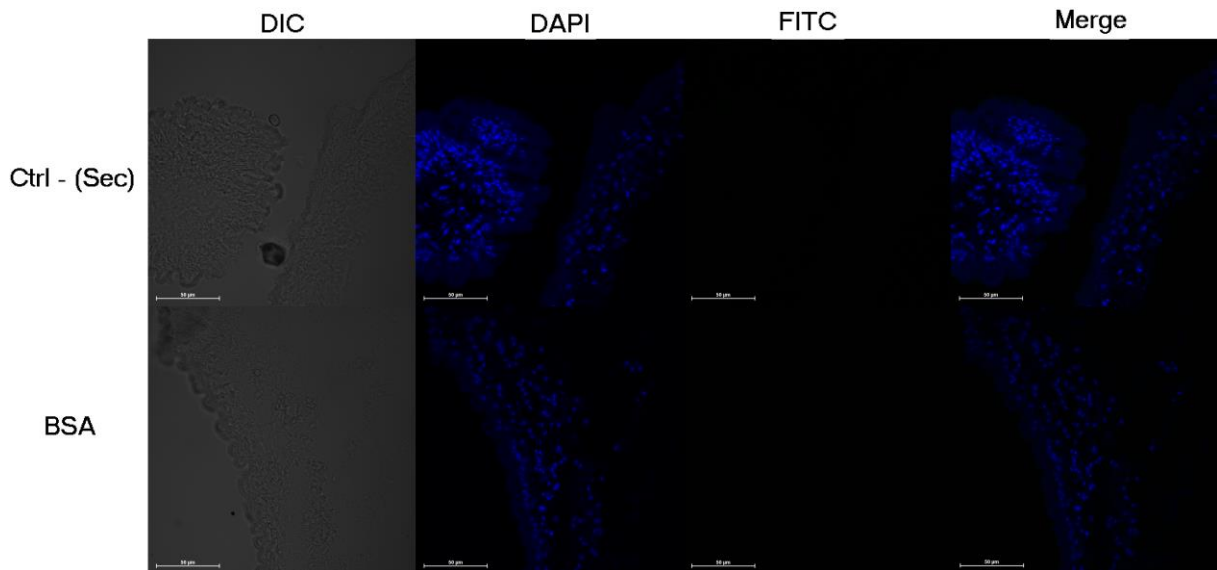


FIGURA 9 – *Cisticercos* submetidos à etapa de incubação com anticorpo primário na presença de BSA 2%. A reatividade inespecífica gerada pela ligação de anticorpos anti-BSA ao tegumento do cisticerco que for a observada no experiment anterior foi eliminada ao diluir o anticorpo primário em solução de bloqueio contendo BSA 2%.

4.2. IMUNOPRECIPITAÇÃO E COLORAÇÃO POR PRATA

Visando caracterizar o antígeno mimetizado pelo peptídeo NC1, foi realizado o procedimento de imunoprecipitação. Devido a dificuldade da obtenção de material proveniente de *Taenia solium* já que os focos de infecção por este estão em regiões rurais, de saneamento precário e com acesso muito limitado as técnicas de diagnóstico, tornando a identificação de pacientes e animais infectados problemática. Logo, para tal experimento foram utilizados antígenos heterólogos de *Taenia crassiceps* (*TcCa*) e de *Taenia saginata* (*TsCa*).

Brevemente, *TcCa* e *TsCa* passaram por incubações na presença dos soros dos camundongos imunizados provenientes do trabalho de Capelli-Peixoto *et al.*, 2011, juntamente com *beads* sepharose ligadas à proteína G. O material obtido pela imunoprecipitação foi submetido à corrida de SDS-PAGE, em gel à 15%, e, por meio da técnica de coloração com nitrato de prata foi possível observar uma banda de aproximadamente 28 kDa, sendo este o provável antígeno mimetizado pelo peptídeo NC1. O fato de a técnica de imunoprecipitação ter isolado bandas de pesos moleculares semelhantes em ambas as espécies de nematodas, corrobora o fato de que tanto a *Taenia crassiceps* quanto a *Taenia saginata*, apresentam grande similaridade com outros vermes da *Taenia spp.*

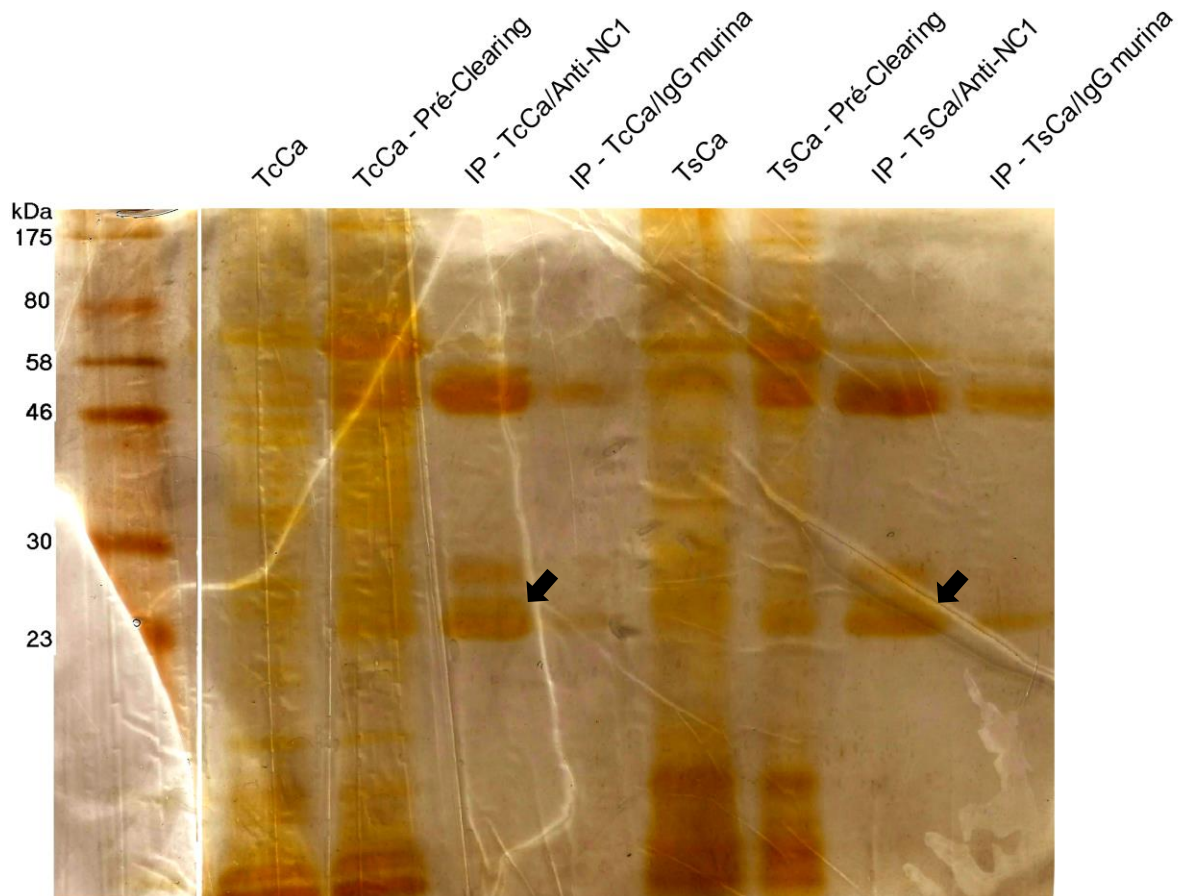


FIGURA 10 – Gel de SDS-PAGE, matriz à 15%. A técnica de imunoprecipitação utilizando o soro anti-NC1 foi capaz de isolar uma proteína de peso molecular de aproximadamente 28 kDa.

4.3. REATIVIDADE DO SORO ANTI-NC1 FRENTE AO PEPTÍDEO NC1 RECÉM SINTETIZADO

O presente trabalho também constou da síntese química manual do peptídeo NC1. O peptídeo após sintetizado, clivado e liofilizado, foi ressuscitado em PBS sendo obtida uma solução de NC1 em PBS na concentração de 2 mg/mL.

Placas de 96 poços foram então sensibilizadas com BSA, TcCa, TsCa, NC1 (O) e NC (N). NC1 (O) foi o peptídeo NC1 utilizado para a realização do trabalho de Capelli-Peixoto *et al.*, 2011; enquanto NC1 (N) foi o peptídeo sintetizado no presente trabalho. Todos os antígenos foram testados contra os soros anti-BSA, anti-NC1 e anti-TcCa.

Foi observado que o soro anti-NC1 foi capaz de reconhecer NC1 (O) e BSA, porém não foi observada reatividade contra NC1 (N). Tal resultado pode indicar tanto

falhas no processo de síntese, bem como a necessidade de otimizar determinados parâmetros do ELISA.

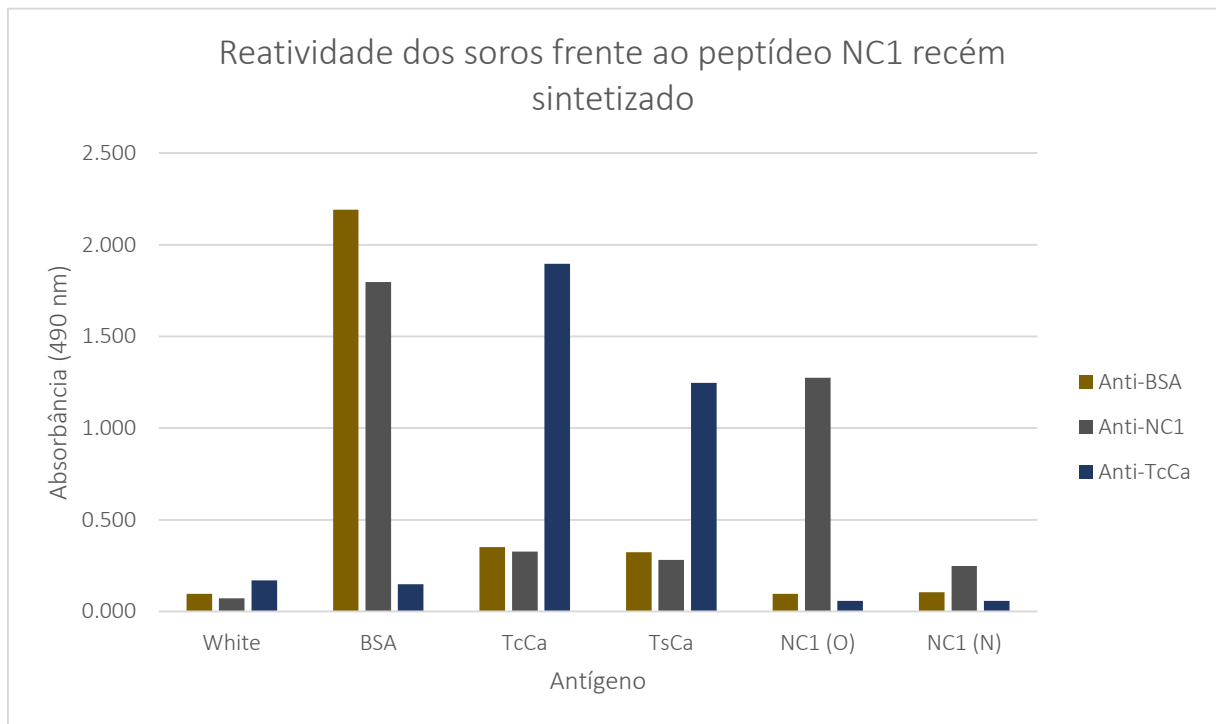


Gráfico 1 – Teste de ELISA avaliando a reatividade do soro anti-NC1 frente ao peptídeo NC1 recém sintetizado. O soro foi capaz de reconhecer tanto o carreador (BSA) quanto o peptídeo NC1 de Capelli-Peixoto (2011), entretanto, não houve reatividade frente ao NC1 sintetizado no presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho não obteve os resultados esperados devido à diversas adversidades técnicas, como dificuldade na padronização dos testes e falta de tempo hábil para a realização de todos os testes propostos. Outro fator limitante é a dificuldade para se obter material para análise, como a obtenção de cisticercos de *Taenia saginata*.

Como já fora demonstrado por Minozzo (2003), as semelhanças bioquímicas entre os antígenos de *T. crassiceps*, *T. saginata* e *T. solium* permite a utilização de antígenos heterólogos para a pesquisa e o diagnóstico, sendo encontrados na literatura diversos trabalhos empregando tais antígenos (MINOZZO *et al.*, 2008 ;PERALTA *et al.*, 2010). O presente estudo, utilizando um soro anti-NC1, um mimotopo de de *Taenia solium*, foi capaz de reconhecer antígenos possivelmente semelhantes tanto em *T. crassiceps* quanto em *T. saginata*. Entretanto, mais estudos serão necessários a fim de identificar o antígeno isolado pela técnica de imunoprecipitação, como, por exemplo, análises por espectrometria de massas.

A ausência de marcação pela lectina WGA corrobora os dados obtidos por Lee e colaboradores (2005) que caracterizaram N-glicanos de metacestodas de *Taenia crassiceps* e demonstraram que seus principais constituintes são fucose, manose e galactose.

Além disso, uma análise de quais moléculas estão diferencialmente expressas nos brotamentos pode ser interessante tendo em vista que os hospedeiros apresentam uma produção anticorpos bem direcionada contra os cisticercos em formação à partir dos cisticercos senescentes e este tipo de informação na literatura é extremamente escassa ou ausente. Tais análises podem fornecer não somente informações com relação a biologia do parasita, bem como podem oferecer novas perspectivas com relação aos mecanismos de defesa empregados por helmintos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPEJEV, S. Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 3B, p. 822-828, 2003.

CAPELLI-PEIXOTO, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; CHAVES-MOREIRA, D.; MINIZZO, J. C.; GABARDOF, J.; TEIXEIRA, K. N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L. M.; DE MOURA, J. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v. 29, n. 51, p. 9473-9479, 2011.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 159821, doi: 10.1100/2012/159821, 2012.

DIXON, H. B. F.; SMITHERS, D. W. Epilepsy in cysticercosis (*Taenia solium*): A study of seventy-one cases. **QMJ: An International Journal of Medicine**, v. 3, n. 4, p. 603-616, 1933.

FABIANI, S.; BRUSCHI, F. Neurocysticercosis in Europe: Still a public health concern not only for imported cases. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 18-26, 2013.

FLISSER, A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. **Progress in Clinical Parasitology**, v. 4, p. 77-116, 1994.

GARCIA, H. H.; RODRIGUEZ, S.; FRIEDLAND, J. S.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 388-396, 2014.

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

GARCIA, H. H.; GONZALES, A. E.; EVANS, C. A. W.; GILMAN, R. H.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, v. 361, n. 9383, p. 547-556, 2003.

GOTTSCHALK, S.; BUZI, K. A.; GALINDO, L. A.; DE ABREU, B. X.; NUNES, C. M.; BIONDI, G. F. Soroprevalência e aspectos epidemiológicos da cisticercose suína em criações de “fundo de quintal” na microrregião de Registro-SP. **Veterinária e Zootecnia**, v.3, n.2, p.192-200, 2006.

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

HELL, R. C. R.; AMIM, P.; DE ANDRADE, H. M.; DE AVILA, R. A. M.; FELICORI, F.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A. P.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 129-138, 2009.

LEE, J. J.; DISSANAYAKE, S.; PANICO, M.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; HASLAM, S. M. Mass spectrometric characterisation of *Taenia crassiceps* metacestode N-glycans. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 143, p. 245–249, 2005.

MAHALE, R. R.; MEHTA, A.; RANGASETTY, S. Extraparenchymal (Racemose) Neurocysticercosis and Its Multitude Manifestations: A Comprehensive Review. **Journal of Clinical Neurology**, v. 11, n. 13, p. 1-9, 2015.

MERCHANT, M. T.; AGUILAR, L.; AVILA, G.; ROBERT, L.; FLISSER, A.; WILLMS, K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 4, p. 681-685, 1998.

MINOZZO, J. C. Imunoeletrotransferencia e enzimoimunoensaio como ferramentas para o imunodiagnóstico da neurocisticercose. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Defesa: Curitiba, 2003.

MINOZZO, J. C.; DE MOURA, J.; ALMEIDA, S. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Crude Antigen from *Taenia crassiceps* Cysticercus Used as Heterologous Antigen in ELISA and in EITB for Neurocysticercosis Diagnosis of Patients from Paraná-Brazil. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 51, n. 6, p. 1127-1137, 2008.

NADAFF, N.; SEEGER, S. K.; STAFSTROM, C. .E. Neurocysticercosis in Wisconsin: 3 Cases and a Review of the Literature. **Wiscosin Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 74-78, 2014.

NASH, T. E.; MAHANTY, S.; LOEB, J. A.; THEODORE, W. H.; FRIEDMAN, A.; SANDER, J. W.; SINGH, G.;CAVALHEIRO, E.; DELBRUTTO, O. H.; TAKAYANAGUI, O. M.; FLEURY, A.; VERASTEGUI, M.; PREUX, P.; MONTANO S.; PRETELL, E. J.; WHITE JR., A. C.; GONZALES, A. E.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Neurocysticercosis: A natural human model of epileptogenesis. **Epsilepsia**, v. 56, n. 2, p. 177-183, 2015.

NDIMUBANZI, P. C.; CARABIN, H.; BUDKE, C. M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y. J.; RAINWATER, E.; DICKEY, M.; REYNOLDS, S.; STONER, J. A. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e870, 2010.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2011. 264 p.

NEWTON, C. R.; GARCIA, H. H. Epilepsy in poor regions of the world. **The Lancet**, v. 380, n. 9848, p. 1193–1201, 2012.

PERALTA, R. H., ESPÍNDOLA, N. M., PARDINI, A. X., IHA, A. H., MOURA, H., BARR, J. R., VAZ, A. J.; PERALTA, J. M. *Taenia crassiceps* cysticerci: characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 295-300, 2010.

SCHANTZ, P. M.; WILKINS, P. P.; TSANG, V. C. W. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant health problem. **Emerging Infections 2**. ASM Press, Washington, DC, p. 213-242, 1998.

SILVA, M.C.; CORTEZ, A. A.; AQUINO-CORTEZ, A.; VALENTE, M.; TONIOLLI, R. Cisticercose suína, teníase e neurocisticercose no município de Barbalha, Ceará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.59, n.2, p.371-375, 2007.

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.

VERSTER, A. Redescription of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. **Zeitschrift für Pararistenkunde**, v. 29, n. 4, p. 313-328

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

YEH, J. & SHEFFIELD, J. S. Cysticercosis: A Zebra in the Neighborhood. **Virtual Mentor**, v. 10, n. 4, p. 220–223, 2008.