UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-IMUNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

CLÓVIS DE OLIVEIRA

Aspectos clínicos da neurocisticercose humana e viabilidade de padronização de teste de ELISA para seu imunodiagnóstico

BELO HORIZONTE
2009

CLÓVIS DE OLIVEIRA

ASPECTOS CLÍNICOS DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA E VIABILIDADE DE PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE ELISA PARA SEU IMUNODIAGNÓSTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Neurociências

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui

BELO HORIZONTE
2009

CLÓVIS DE OLIVEIRA

ASPECTOS CLÍNICOS DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA E VIABILIDADE DE PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE ELISA PARA SEU IMUNODIAGNÓSTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui

Aprovado em: _____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof[a]. Dra. Leonor Bezerra Guerra
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Membro Titular

Prof[a]. Dra. Claúdia Lopes Penaforte
Departamento de Ciências Biológicas, Ambientais e da Saúde
UniBH
Membro Titular

Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Orientador

Belo Horizonte, 05 de agosto de 2009

Dedicatória

À minha família

Minha espôsa: Zélia
Nossos filhos: Dulcilene, Fabiana, Serge e Cristiana

Minhas irmãs: Célia e Conceição

e

"In Memorian"

Meus Pais: Laurindo e Dulce
Meus irmãos: Clésio e Cleusa.

“ É a sua missão
Que é abençoada
E é a Luz da Paz
Que ilumina a sua estrada
A vida não é sofrida
E eu sei
Que a nossa alma não está ferida
E é no Coração de Jesus
Que a nossa prece é acolhida.”

(Lucian “Poeta” Henrique Vicente de Carvalho Paula
Aluno das Oficinas Facilitadoras – APAE-Barbacaena MG)

“Ominia ab uno et in unum omnia
Lege, lege, relege, ora et labora et invenies”
(Mutus Liber)

AGRADECIMENTOS

Á Profª. Dra. Angela Maria Ribeiro, pela oportunidade, pela ajuda, pelo incentivo, pela ética e profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui, pela acolhida, pela oportunidade, pela ética e profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Tomaz A. M. dos Santos, pelas sugestões, pelo exemplo, pela simpatia, pela ética e profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho pelo auxilio e sugestões, pela amizade, pela ética e profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Antonio Lúcio Teixeira Jr., pela amizade, pelas sugestões sempre construtivas, pela motivação, pela ética, pelo profissionalismo;

À todos os Professores e Colegas do Curso de Pós-Graduação em Neurociências;

À Mestranda em Neurociências, Dulcilene Mayrink de Oliveira, minha filha, pela inestimável ajuda no laboratório, pelos conselhos, por ter me posto à par dos novos conceitos em bioquímica e imunologia;

Aos Colegas do Laboratório de Imunoquimica de Proteínas, pelo companheirismo, pelas sugestões, pela motivação e pelo convívio agradável;

Aos Professores, Colegas e Técnicos do Departamento de Bioquimica e Imunologia pelo convívio agradável e auxilio, pela ética e profissionalismo;

Ao Jamil, pelo auxilio técnico e amizade, pela ética e profissionalismo;

Ao Orlando, gestor de eventos da UFMG, pela amizade, ética e profissionalismo;

Às Secretárias do Curso de Pós-Graduação em Neurociências: Adriana, Jaqueline, Dona Neli e Fabiana pela competência e profissionalismo;

À Dona Léa Paolluci Cascapera, Diretora Executiva, e à Helena, chefe do Núcleo Administrativo-Financeiro da APAE-Barbacena MG, pela compreensão e apoio;

À Enfermeira Rosa e à Técnica de Enfermagem Elisa do setor de Primeiros Socorros da APAE-Barbacena MG, pelo valioso auxilio na coleta dos soros dos pacientes;

À Sônia Maria de Oliveira, Secretária Executiva da APAE-Barbacena MG, pelo incentivo e sobretudo por acreditar na viabilidade das minhas idéias e do meu trabalho.

À Equipe Técnica e Funcionários da APAE – Barbacena MG pelo apoio;

À Célia, minha irmã, Secretária do consultório, pela dedicação na seleção dos pacientes;

Aos meus pacientes que tornarão possível a realização deste projeto;

À FAPEMIG e ao CNPq, indispensáveis para a realização deste trabalho;

Finalmente, gostaria de agradecer à **Deus** por ter me permitido chegar até aqui e conhecer todos vocês,

Muito Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância

ADNPM – Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor

AV – Atrio-Ventricular

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BHE – Barreira hematoencefálica

C3b – Opsonina

CHAPS – *Cholomidopropyl dimethylammonio proanesulfonate* (colomidopropil dimetilamônio proanesufonato)

Coltec – Colégio Técnico

DO – Densidade óptica (índice de absorbância)

DVP – Derivação ventriculoperitoneal

EDTA – *Ethylenediamine tetracetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EEG – Eletroencefalograma

EITB – Teste de imunoeletrotransferência

ELISA – Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima

FAE – Fármaco antiepiléptico

F-moc – Fluorenil metil oxicarbonila

HPJ – Teste coprológico pelo método de *Hoffman, Pons, Janer*

HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de grande desempenho)

IFN- γ - Interferon Gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

IVCI – Insuficiência Vascular Cerebral Intermitente

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MSD – Membro superior direito

NCC – Neurocisticercose

NSS – Sem neurocisticercose

OGM – Organismo geneticamente modificado

OPD – Ortofenilodiamina

PBS – *Phosphate Buffer Saline* (Tampão fosfato salino)

pepNCC – Peptídeo sintético da neurocisticercose

PMSF – *phenylmethanesulphonylsulphony fluoride* (Fluorêto de fenilmetanosulfonilsulfona)

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

ROC – *Receiver Operator Characteristic* (Eficiência do operador de recepção de sinais)

SHI – Síndrome de hipertensão intracraniana

SNC – Sistema Nervoso Central

SPACc – *Scolex Protein Antigen from Cysticercus cellulosae* (Antigeno protéico do escólex do *Cysticercus cellulosae*)

TC – Tomografia Computadorizada

TDR – Tecnologia do DNA recombinante

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

TPCK – Tosyl phenylalanyl chlorometyl ketone (Tosilfenilalanilclorometilcetona)

Tris – 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (detergente)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1. – Ciclos biológicos da *T. solium* e *T. saginata*..... 2

Fig. 1.2. – Cisticercose subcutânea..... 7

Fig. 1.3. – Cisticercose muscular..... 7

Fig. 1.4. – Distribuição da NCC no mundo..... 9

Fig. 1.5. – Distribuição da NCC no território brasileiro..... 11

Fig. 1.6. – Morfologia da *Taenia saginata*..... 14

Fig. 1.7. – Morfologia da *Taenia solium*..... 14

Fig. 1.8. – Morfologia do *Cysticercus cellulosae*..... 15

Fig. 1.9. – Neurocisticercose racemosa..... 16

Fig. 1.10. – Cisticercose ocular.....22

Fig. 1.11.– Neuroimagens e aspectos cirúrgicos da neurocisticercose raquidiana..... 23

Fig. 1.12.– Neuroimagens dos diferentes estágios da neurocisticercose..... 28

Fig. 1.13.– Neuroimagens dos segmentos dorsal e lombossacro da coluna vertebral..... 29

Fig. 1.14. – Estágios do teste de ELISA 44

Fig. 1.15. – A expressão fenotípica em bacteriófagos..... 44

Fig. 4.1. – Gráfico de barras para a variável sexo..... 51

Fig. 4.2. – Histograma para a variável idade..... 52

Fig. 4.3. – Histograma para a variável nódulo..... 52

Fig. 4.4. – Gráfico de dispersão das variáveis Idade versus Nódulos..... 53

Fig. 4.5. – Gráfico de barras para a variável Exame..... 54

Fig. 4.6. – Grafico de barras para a variável Diagnóstico NCC..... 55

Fig. 4.7. – Gráfico da titulação do SPACc..... 58

Fig. 4.8. – Gráfico do teste ELISA-SPACc..... 59

Fig. 4.9. – Gráfico de dispersão do teste ELISA-SPACc relacionando Soros versus Manifestações Clínicas..... 60

Fig. 4.10. – Gráfico de dispersão do teste ELISA-SPACc relacionando Soros versus Nódulos..... 60

Fig. 4.11. – Gráfico da titulação do pepNCC..... 61

Fig. 4.12. – Gráfico do teste ELISA-pepNCC..... 62

Fig. 4.13. – Gráfico da dispersão do teste ELISA-pepNCC relacionando Soros versus Manifestações Clínicas..... 63

Fig. 4.14. – Gráfico de dispersão do teste ELISA-pepNCC relacionando Soros versus Número de Nódulos..... 64

Fig. 4.15. – Curva ROC para os testes ELISA-pepNCC e ELISA-SPACc..... 66

LISTA DE TABELAS

Tab. 1.1. – Filo platelminto. Cestodeos de interesse sanitário..... 4

Tab. 1.2. – Principais diferenças entre *T. solium* e *T. saginata*..... 13

Tab. 1.3. – Critérios diagnósticos para a NCC..... 30

Tab. 1.4. – Diagnósticos definitivo e provável relacionados aos critérios diagnósticos para a NCC..... 3 0

Tab. 1.5. – Diagnóstico diferencial da NCC..... 31

Tab. 1.6. – Diagnóstico da NCC através da neuroimagem..... 31

Tab. 1.7. – Proposições para tratamento da NCC baseadas no nível de qualidade de evidencia..... 37

Tab. 4.1. – Tabela de freqüências para a variável Sexo..... 51

Tab. 4.2. – Tabela de freqüências para as variáveis Idade e Nódulos..... 53

Tab. 4.3. – Tabela de freqüências para a variável Exame..... 54

Tab. 4.4. – Tabela de freqüências para a variável Diagnóstico Clinico da NCC..... 55

Tab. 4.5. – Tabela de freqüências para a variável Manifestações Clínicas..... 57

Tab. 4.6. – Tabela de freqüências para o teste de diferença de proporções..... 64

Tab. 4.7. – Parâmetros de acurácia de um teste Diagnóstico..... 65

Tab. 4.8. – Áreas abaixo das Curvas ROC para ELISA-pepNCC e ELISA-SPACc..... 66

RESUMO:

Aspectos clínicos da neurocisticercose humana e viabilidade de padronização de teste de ELISA para seu imunodiagnóstico

A neurocisticercose (NCC), neuroparasitose ocasionada pelo *Cysticercus cellulosae*, forma larvária da *Taenia solium*, tem alta incidência nos países em desenvolvimento, principalmente no Brasil. O seu diagnóstico baseia-se nos achados clínicos e, principalmente, nos exames de neuroimagens, nem sempre acessíveis às populações carentes. O diagnóstico clínico da neurocisticercose é complicado devido ao polimorfismo das manifestações comuns à várias comorbidades. O desenvolvimento e padronização de um teste sorológico simples e eficaz para o diagnóstico da doença seria, pois, de grande ajuda nos estudos epidemiológicos, na prevenção e na conduta terapêutica da doença. No presente trabalho, além dos aspectos clínicos da NCC, um peptídeo (pepNCC) identificado e selecionado pela técnica expressão de moléculas na cobertura de bacteriófagos filamentosos (*Phage display*) foi sintetizado e utilizado em experimentos tipo ELISA para a definição de sensibilidade e especificidade em relação às amostras de soros de pacientes com NCC. Dois grupos foram estudados: Grupo I constituído de amostras de soros de indivíduos normais (n=23), para controle negativo e elaboração do ponto de corte (cut-off) do experimento, e Grupo II constituído de soros de 57 pacientes e subdivididos em dois subgrupos: pacientes sem neurocisticercose, NSS (n=34), e pacientes com neurocisticercose, NCC (n=23), confirmada através de exames de imagens (TC e RNM). Alguns pacientes dos subgrupos NSS e NCC apresentavam outras comorbidades que foram listadas e incluídas no estudo. Os resultados obtidos demonstraram que o peptídeo sintético foi capaz de reconhecer amostras de soros de pacientes com NCC quando comparado com o extrato solúvel do escólex do *Cysticercus cellulosae* (SPACc) num teste tipo ELISA. A análise estatística, neste estudo, evidenciou que a sensibilidade do teste ELISA-peptídeo foi apenas ligeiramente maior que a sensibilidade do teste ELISA-SPACc . A especificidade do teste ELISA-SPACc foi maior, porém, levando-se em consideração que não houve diferença significativa entre os testes, essa variação é, possivelmente, aleatória. Além disso, através da análise da Curva ROC (*receiver operator characteristic*) evidenciou-se que o teste ELISA-peptídeo, para essa amostra especifica, aparenta ser melhor que o teste de ELISA-SPACc, apesar de não existir diferença significativa entre eles. Novos estudos com melhores amostras para o controle negativo e elaboração do ponte de corte deverão tornar mais reais os índices sensibilidade e especificidade do pepNCC.

Descritores: Neurocisticercose, aspectos clínicos, *phage display*, peptídeo sintético, ELISA

ABSTRACT:

Clinical aspects of the human neurocysticercosis and viability of standardization of ELISA' test for your immunodiagnostic methods

The neurocysticercosis (NC), infection caused by the *Cysticercus cellulosae*, larvae form of the *Taenia solium*, has high incidence in the countries in development, mainly in Brazil, where its prevalence is higher. Diagnosis its bases on the clinical aspects and, mainly, in the imaging technology, such as computerized tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI), techniques that are expensive and frequently inaccessible in endemic areas and to the lacking populations. The diagnosis and practice medicine him of the NC it is complicated due to the polimorfism of the manifestations common to the several comorbities. The development and standardization of a simple, effective and serological test for the diagnosis of the disease would be, therefore, of great help in the epidemiological studies, in the prevention and in the therapeutic of the disease. In the present work, besides the clinical aspects of NC, a peptíde (pepNC), identified and selected by the expression of molecules in the covering of filamentous bacteriophages technique (Phage display), was synthesized and used in experiments type ELISA for the sensibility and specificity definition in relation that samples of patients' sera with NC. Two groups were studied; Group I constituted of samples from normal patients sera (n=23) for negative control and elaboration of the cut point (cut-off) of the experiment and the Group II constituted from sera of 57 patients and subdivided in two subgroups; patients without neurocysticercosis, NS (n=34) and patients with neurocysticercosis, NC (n=23) confirmed through imaging exams (CT and MRI). Some patient of the subgroups NS and NC presented other comorbities that were striped and included in the study. The obtained results demonstrated that the synthetic peptide was capable found to be recognize samples of patients' sera with NC when compared with the scolex protein antigen from *Cysticercus cellulosae* (SPACc) in a test type ELISA. The statistical analysis, in this study, evidenced that the sensibility of the test ELISA-peptide was just lightly larger than the sensibility of the test ELISA-SPACc. The specificity of the test ELISA-SPACc was larger, however, being taken in consideration that there was not significant difference among the tests, that variation is, possibly, aleatory. Besides, through ROC's curve analysis (receiver operator characteristic) was evidenced that the test ELISA-peptide, for that sample specifies, it pretends to be better than the test of ELISA-SPACc, despite no significant difference exist among them. New studies with better samples for the negative control and elaboration of the cut bridge should turn more real the indexes sensibility and specificity of the pepNC.

Key Words: Neurocysticercosis, clinical aspects, phage display, synthetic peptíde, ELISA

Clóvis de Oliveira

Título de Especialista em Neurologia Clínica pela
Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro (1977)

Residência Concursada em Neurologia Clinica pelo
Instituto de Neurologia Deolindo Couto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (1977–1978)

Graduação em Medicina pela
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (1971–1976)

SUMÁRIO

Dedicatória..... i
Epígrafe..... ii
Agradecimentos..... iii
Lista de Abreviaturas..... iv
Lista de Figuras..... vi
Lista de Tabelas..... viii
Resumo..... ix
Abstract..... x

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. O Complexo Teníase-Cisticercose..... 1
1.2. Revisão da Literatura..... 4
1.2.1. A Teníase Humana..... 5
1.2.2. A Cisticercose Humana..... 6
1.2.3. A Cisticercose em Animais..... 7
1.2.4. A Neurocisticercose Humana..... 8
1.2.4.1. Epidemiologia..... 9
1.2.4.2. Aspectos Biológicos..... 11
1.2.4.3. Aspectos Imunológicos..... 16
1.2.4.4. Manifestações Clínicas..... 19
1.2.4.5. Etiopatogenia..... 24
1.2.4.6. Diagnóstico..... 25
1.2.4.7. Diagnóstico Diferencial..... 30
1.2.4.8. Tratamento..... 32
1.2.4.9. Profilaxia..... 36
1.3. Ensaio Tipo ELISA como Ferramenta Diagnóstica..... 40
1.3.1. Marcadores Moleculares e Genômica..... 40
1.3.2. A Expressão Fenotípica em Bacteriófagos (*Phage Display*)..... 42

2. OBJETIVOS..... 45
2.1. Gerais..... 45
2.2. Específicos..... 45

3. METODOLOGIA..... 46
3.1. Desenho de Estudo..... 46
3.2. Pacientes e Grupos de Estudo..... 46
3.3. Síntese Química do Peptídeo (pepNCC) selecionado por *Phage Display*..... 47
3.4. Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* (SPACc)..... 47
3.5. Reatividade de Soros Humanos frente ao SPACc (ELISA-SPACc)..... 48
3.6. Reatividade de Soros Humanos frente ao pepNCC (ELISA-peptídeo)..... 49
3.7. Análise Estatística..... 50

4. RESULTADOS..... 51
4.1. Análise Descritiva dos Dados..... 51

4.1.1. Variável Sexo..... 51
4.1.2. Variáveis Idade e Nódulos..... 52
4.1.3. Variável Exame de Neuroimagem..... 54
4.1.4. Diagnóstico Clínico da NCC utilizando-se Exames de Neuroimagem..... 55
4.2. Titulação do Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* (SPACc)..... 56
4.3. ELISA-SPACc como Teste Imunodiagnóstico para a NCC Humana..... 58
4.4. Diagramas de Dispersão para ELISA-SPACc..... 59
4.4.1. Variáveis Manifestações Clínicas e Número de Nódulos relacionados ao Teste ELISA-SPACc para a NCC Humana..... 59
4.5. Titulação do Peptídeo (pepNCC)..... 61
4.6. ELISA-peptídeo como Teste Imunodiagnóstico para a NCC Humana..... 62
4.7. Diagramas de Dispersão para ELISA-peptídeo..... 63
4.7.1. Variáveis Manifestações Clínicas e Número de Nódulos relacionados ao Teste ELISA-peptídeo para a NCC Humana..... 63
4.8. Análise Estatística dos Dados..... 64
4.8.1. Teste para Diferença de Proporções..... 64
4.8.2. Sensibilidade e Especificidade dos Testes Imunodiagnósticos ELISA-SPACc e ELISA-peptídeo..... 65
4.8.3. Curva ROC..... 66

5. DISCUSSÃO..... 67

6. CONCLUSÃO..... 72

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 73

8. ANEXOS
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Anexo B – Ficha de Dados Clínicos e Coleta de Material

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1. O Complexo Teníase-Cisticercose

A elevada densidade populacional observada hoje nas grandes cidades, o crescimento desordenado, caótico dos centros urbanos originam as periferias, denominadas cinturões de pobreza, diretamente relacionadas com níveis sócio-econômico-culturais baixos e precariedade das condições de saúde e higiene. Todos estes fatores criam, entre outros, um ambiente suficientemente favorável ao desenvolvimento de endoparasitoses. A alta prevalência destas entre as populações de baixo nível sócio-econômico- cultural é diretamente resultante do padrão de vida, higiene, educação e saneamento básico deficientes e inadequados associados à pobreza, fome, analfabetismo e injustiça social (**Sciutto, E. *et al.***, 2000).

O complexo teníase-cisticercose constitui-se de duas entidades mórbidas causadas pelo mesmo céstódio em fases diferentes de seu ciclo de vida, resultando em verdadeiro flagelo nos países, ou localizações, onde mantém o seu caráter de endemicidade. No Brasil, essa endoparasitose atinge altos índices de incidência e prevalência e evidencia-se em sério problema de saúde pública. Nesse complexo o homem assume o papel de hospedeiro definitivo, quando abriga em seu intestino o verme adulto, a tênia, e ocasionalmente de hospedeiro intermediário, ou acidental, quando abriga em seus tecidos e órgãos a forma larvária, o cisticerco. Portanto, no homem, a teníase é obrigatóriamente de localização entérica enquanto a cisticercose pode acometer qualquer tecido e/ou víscera. Quando acomete o encéfalo e/ou a medula espinhal recebe o nome de neurocisticercose (NCC) (**Alarcon, G.T., Olivares, L.L.**, 1975).

Para assegurar a sobrevivência da espécie, o ciclo biológico dos parasitas compreende diversas fases vitais. As formas animais de vida parasitária obrigatória necessitam de um

hospedeiro (biotopo) para perfazerem parte de seu ciclo vital. No complexo teníase-cisticercose os parasitas (*Taenia solium* e *Taenia saginata)* por serem heteroxênicos, ou de ciclo indireto, requerem uma alternância de dois hospedeiros (diheteroxênicos), um definitivo (homem) e outro intermediário (porco ou boi), vivendo o verme adulto, tênia ou solitária, fixado à mucosa intestinal do jejuno humano e a forma larvária, cisticerco, nos tecidos e/ou vísceras do porco, boi, ou no caso de contaminação acidental, no humano. No intestino delgado as proglotes grávidas, com os úteros repletos de ovos, desprendem-se do estróbilo do verme adulto, são eliminadas pela defecação, ou espontaneamente, chegam ao meio ambiente, são ingeridas pelo suíno ou bovino e se transformam, em seus tecidos ou vísceras, na forma larvar ou cisticerco. O homem torna-se hospedeiro definitivo ao ingerir a carne contaminada destes dois animais, ou hospedeiro intermediário, acidental, ao ingerir os ovos do parasita fechando, dessa forma, os ciclos biológicos evolutivos do parasita, conforme ilustrado no esquema abaixo (**Larralde, C., *et al.***, 1992).

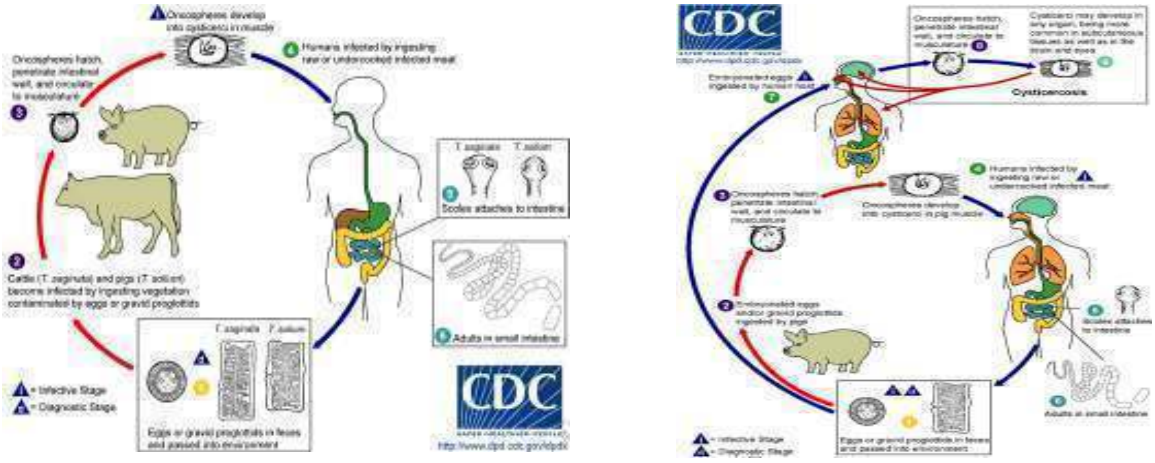


Fig. 1.1. Esquema ilustrativo dos ciclos biológicos das *T. solium* e *T. saginata*
Fonte: (www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Taeniasis.htm-2008)

Dentre as diversas formas de cisticercose, a NCC é de diagnóstico difícil e complicado devido ao pleomorfismo de suas manifestações clínicas. É baseado no exame neurológico, testes sorológicos e/ou liquóricos e em exames de imagem (tomografia computadorizada e

ressonância nuclear magnética), esses últimos nem sempre acessíveis às populações de baixa renda. Testes imunodiagnósticos de amostras de soro têm sido utilizados para avaliar a prevalência da cisticercose e excluir ou confirmar o diagnóstico de NCC (**Sotelo, J.** and **Del Brutto, O. H.**, 2002)

As medidas gerais para o controle do complexo teníase-cisticercose, e por extensão a neurocisticercose, dependem das características epidemiológicas da doença na região, inclusive as condições econômicas, sociais e culturais, sendo que a estratégia principal seria interromper o ciclo evolutivo do parasita evitando, assim, a infestação nos animais e na população humana. Fundamentalmente, seria melhorar as condições de saneamento básico do meio ambiente, tratamento de toda a população da região endêmica, organização na criação de animais evitando que tenham acesso à fezes humanas, inspeção veterinária dos produtos animais, proibição de abate e comercialização de produtos clandestinos e educação em saúde e hábitos de higiene (**Gemmel, M.** ***et al,*** 1983). Outra medida importante seria a vacinação dos animais (**Gonzalez, A. E.,** ***et al.***, 2005).

O tratamento da teníase-cisticercose humana, em qualquer caso, pode ser clínico, sintomático, medicamentoso, utilizando antiparasitários (albedanzol, praziquantel, niclosamina), ou cirúrgico, dependendo do número, tamanho, localização e estágio de atividade dos cistos (**Salud, Organizacion Panamericana de la,** 1994). Como contribuições de prevenção e tratamento existem, no Brasil e no mundo, várias medidas para tornar o complexo teníase-cisticercose como doença de notificação compulsória criando condições de investigações e intervenções epidemiológicas na tentativa de interromper a cadeia de transmissão da infestação (**Román, G.** ***et al.***, 2000).

1.2. Revisão da Literatura

No homem, a teníase tem pouca ou quase nenhuma evidências clínicas. Por outro lado, a cisticercose é caracterizada por reações biológicas parasita-hospedeiro (tanto no homem quanto no animal), exuberantes e diversificadas, principalmente quando o tecido afetado é o neural configurando quadro clínico de NCC. Existem relatos de longa data, relacionados ao complexo teníase-cisticercose. A cisticercose suína foi descrita, no século III a.C., por Aristóteles e Aristófanes. No papiro Elbers existem evidências de que os egipicios já conheciam a teníase(**Sarti, E., *et al.***, 2000).

A classe *Cestoda*, pertencente ao *Phylum Platyhelmintes*, compreende cerca de uma dúzia de ordens sendo que duas delas, *Pseudophyllidea* e *Ciclophyllidea*, possuem interesse sanitário por incluírem as espécies, tanto no estado adulto ou larvário, que parasitam o homem. A tabela 1.1 exemplifica alguns cestódeos que possuem interesse sanitário.

Tabela 1.1 – Filo Platelminto. Cestódeos de interesse sanitário
(adaptado de Berenguer, J. G. Manual de Parasitologia. Traduzido. Ed. Argos 2006)

Ordem	Gênero	Espécie	Larva
Cyclophyllidae	*Taenia*	*Taenia Solium*	*Cysticercus cellulosae*
		Taenia saginata	*Cysticercus bovis*
		Taenia crassiceps	*Cysticercus longicollis*
	Echinococcus	*Echinococcus granu-losus*	Cisto hidático unilocu-cular
		Echinococcus mult-locularis	Hidátide alveolar
	Hymenolepis	*Hymenolepis nana*	Cisticercóide
	Dipylidium	*Dipylidium caninum*	Cisticercóide
Pseudophyllidea	*Diphyllobothrium*	*Diphyllobothrium latum*	Coracídeo
	Spirometra	*Spirometra mansonoides*	Espargonose

No Brasil são endêmicos e com inadequados meios de controle; a teníase e a cisticercose produzidos principalmente pela *Taenia solium*.

1.2.1. A Teníase Humana

As duas espécies de tênias, *Taenia solium* e *Taenia saginata*, podem parasitar o intestino delgado do homem sendo mais comum o parasitismo pela *Taenia solium*. A *Taenia solium* é um cestódeo cosmopolita sendo amplamente encontrado na China, Polônia, Rússia, Índia, África, América Central, América do Sul e alguns bolsões endêmicos da América do Norte (**Del Brutto, O.H.**, 1999). É rara, ou ausente, nos países cujas populações professam os credos religiosos muçulmano ou judaico que proíbem o consumo de carne suína. O ato de consumir carne de porco de procedência duvidosa, hábitos de defecção humana no meio ambiente, controle veterinário insuficiente da carne suína, associados ao fato do animal ser criado em relativa liberdade e ter hábitos coprofágicos propiciam a infecção no humano.

A *Taenia saginata*, ou solitária inerte, por não possuir rostro e acúleos, tem o corpo mais grosso e é mais comprida que a espécie anterior. O humano contaminado ao defecar no meio ambiente propicia a dispersão, através dos ventos, das chuvas e das aves, das proglotes e ovos, pela vegetação herbácea das pastagens do gado bovino que cumpre o papel de hospedeiro intermediário da forma larvária, o *Cysticercus bovis*. O humano ao ingerir a carne bovina contaminada adquire a teníase, fechando e perpetuando o ciclo evolutivo do parasita. O congelamento da carne bovina entre -20 à -22°C, tanto nos matadouros industriais como nos congeladores domésticos, tem diminuído consideravelmente a prevalência desta teníase cosmopolita. Outro cestódeo de importância sanitária e epidemiológica é a *Taenia asiática*, considerada por alguns autores como uma subespécie da *Taenia saginata*, endêmica no sudeste asiático (Taiwan e Coréia) (**Sotelo, J.** and **Del Brutto, O. H.**, 2002).

1.2.2. A Cisticercose Humana

A infecção humana pela larva da *Taenia solium*, o *Cysticercus cellulosae*, configura o quadro clinico de cisticercose. Ocorre pela ingestão dos ovos excretados junto com as fezes de indivíduos portadores do verme adulto. A contaminação se dá através de alimentos ou água contaminados, ou alternativamente pela via ânus-bôca ou por regurgitação para o estômago, onde por ação do suco gástrico a oncosfera se liberta, atravessa a mucosa e penetra na circulação sanguinea. Migrando através do corpo, a larva pode parasitar vários tecidos ou órgãos, tais como, sistema músculo-esquelético, tecido subcutâneo, olho e sistema nervoso central (SNC) constituindo nesse último na mais freqüente parasitose, a neurocisticercose (NCC) (**White, A. C., Jr.**, 1997). As manifestações clinicas da cisticercose estão na dependência do órgão afetado. Morbidade acentuada geralmente está associada à neurocisticercose (encefálica e medular) e cisticercose oftálmica. Fora destes dois sítios a cisticercose causa pouca ou nenhuma sintomatologia. Em casos raros uma carga maciça de parasitas pode levar à cisticercose de localização dérmica, com distribuição de numerosos nódulos subcutâneos, (**Fig. 1.2.) (Singrodia, S., et al., 2008)**, ou muscular com aumento do diâmetro do músculo configurando quadro clinico de pseudohipertrofia (**Fig. 1.3.)**. Em tôrno de 5% dos pacientes o músculo cardíaco pode ocasionalmente ser parasitado, entretanto, a cisticercose cardíaca é praticamente assintomática (**Rabiela, M.T., et al.**, 1982). Como existe uma estreita relação entre teníase e cisticercose, uma das formas de prevenir a infestação seria diagnosticar, tratar e educar com medidas sanitárias adequadas os pacientes portadores da teníase que com seus maus hábitos higiênicos podem contaminar outros indivíduos bem como se autocontaminarem. Uma das complicações mais temidas da cisticercose é a NCC que pode evoluir com altos índices de morbidade e mortalidade.

Fig. 1.2. – Cisticercose subcutânea (**Singrodia, S.,** *et al*. 2008)

Fig. 1.3. – Cisticercose Muscular (**Garcia, H.H.,** *et al*. 2003)

1.2.3. A Cisticercose em Animais

O hábito, pouco higiênico, de defecar no meio ambiente pode fazer com que bovinos e suínos sejam infectados e desenvolvam cisticercos em seus tecidos e órgãos (**Garcia, H.H., et al.**, 2003). Os suínos, por serem animais coprofágicos, têm mais facilidade de ingerir fezes contaminadas com os ovos da solitária e geralmente são os animais mais infectados. O bovino evita as pastagens com fezes, entretanto, em condições adversas, onde haja falta de alimentos, podem ingerir fezes. Por outro lado, a viabilidade dos ovos da tênia no meio ambiente propicia a infecção sem que necessariamente haja ingestão de fezes contaminadas.

A inspeção e controle sanitário das carnes bovinas e suínas em frigoríficos e matadouros consiste em inspeção palpação e cortes dos músculos, principalmente, da musculatura intercostal, da cabeça, pescoço, diafragma, língua e coração (**Brasil, M. A.**, 1980). Os suínos criados por pequenos produtores no meio rural ou mesmo em pequenas propriedades, para o próprio consumo ou para vendas em mercados e feiras, sem inspeção sanitária e sem os meios adequados de higiene, concorrem para o aumento da cisticercose em hospedeiros não humanos e posteriormente da teníase e cisticercose em humanos.

O desenvolvimento dos cisticercos nos bovinos ocorre, em média, em 60 à 75 dias sendo que, no prazo máximo de nove meses, os cistos começam à degenerar e morrer com

posterior calcificação (**Acha, P., Szifre, B.** , 1986). Nos suínos, o desenvolvimento dos cisticercos se situa em torno de 60 dias e permanece infectante por vários anos (**Rey, L.** , 1992).

A resposta imune dos animais, bovinos e suínos, depende do tempo entre as ingestões dos ovos (exposições) e não do número de ovos ingeridos. Todavia o conhecimento da imunidade dos animais frente à cisticercose ainda não foi muito bem esclarecido (**Gemmell, M.A.**, 1987). O cisticerco, por possuir interações complexas com o hospedeiro, torna difícil o estudo dos mecanismos de sobrevivência do parasita tanto quanto os de defesa do hospedeiro. Parece existir uma grande diversidade antigênica entre os cisticercos da *Taenia solium*, o que leva a vários tipos de resposta imunológica por parte do hospedeiro (**Yakoleff-Greenhouse, V., et al.**, 1982). Ao degenerar, o parasita libera antígenos que estimula a resposta imunológica com reação inflamatória granulomatosa e linfocítica crônica com morte e calcificação do parasita. Nesta resposta estão presentes; células mononucleares, eosinófilos, linfócitos B e monócitos/macrófagos MHC-IIA. Esta reposta imune pode estar ausente se o parasita tiver apresentado os mecanismos de evasão imunológica e imunotolerância o que pode levar à sua sobrevivência por vários anos no hospedeiro. A vacinação dos animais contra a cisticercose suína pode remover um dos grandes fatores que propicia a infecção dos humanos pela larva da *Taenia solium* (**Del Brutto, O. H., et al.**, 2001).

1.2.4. A Neurocisticercose Humana

A cisticercose pode acometer qualquer tecido ou víscera do corpo. Quando ocorre no sistema neural recebe o nome de neurocisticercose (NCC) sendo atualmente reconhecida no mundo todo como um importante e grave problema de saúde pública.

1.2.4.1. Epidemiologia

O complexo teníase-cisticercose é problema de ocorrência mundial, tanto nos países em desenvolvimento quanto naqueles desenvolvidos, nesses últimos devido às constantes migrações de pessoas oriundas de populações de regiões endêmicas. A cisticercose do sistema nervoso central, NCC, torna-se, por conseguinte, endêmica nas mesmas regiões. A infecção do SNC pela forma larvária da *Taenia solium*, o *Cysticercus cellulosae*, é grande fator causal de epilepsia e mortalidade nos países em desenvolvimento (**WHO**, 2002). A figura abaixo esquematiza, aproximadamente, as regiões de distribuição da NCC.

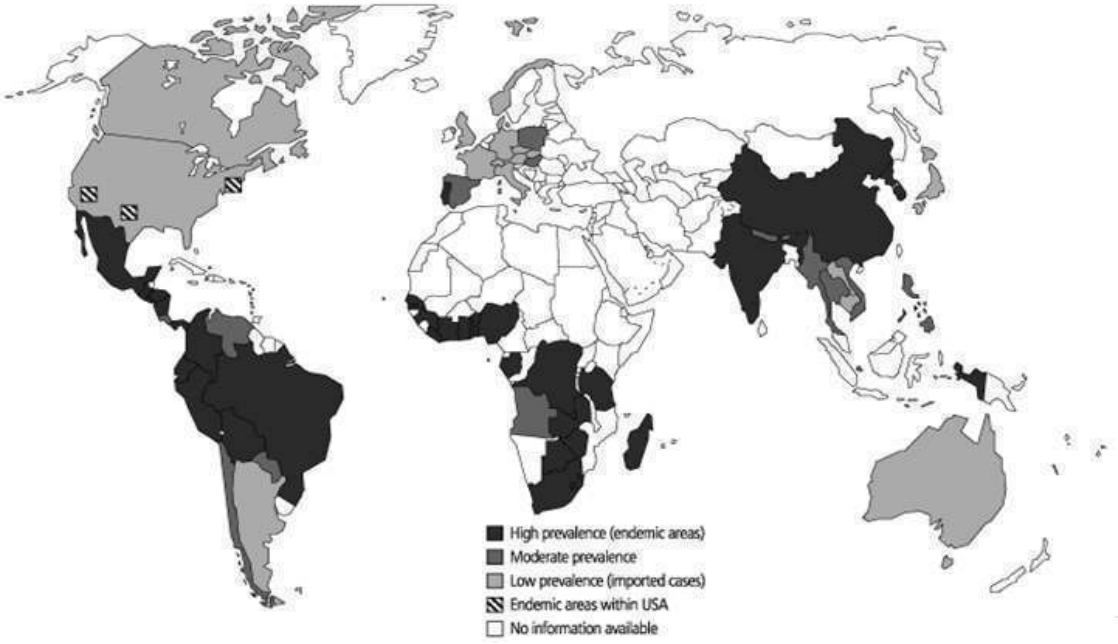


Fig. 1.4. – Regiões de distribuição da NCC no mundo (**WHO**, 2002).

Segundo Boletim da Organização Mundial de Saúde (**WHO,** 2002), o complexo teníase-cisticercose e a NCC acometem 50 milhões de indivíduos no mundo. Provoca, anualmente, cerca de 50 mil mortes. Afeta, provocando uma grande variedade de comorbidades, milhares de pessoas nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos a incidência aumenta devido à imigração constante de pessoas de áreas endêmicas. As regiões

endêmicas no mundo, com suas fronteiras de forma aproximada, são: Região sub-Saara da África, Índia, Ásia, América Central, América do Sul, América do Norte (casos importados no Cánada e Estados Unidos), Leste Europeu (casos importados), Peninsula Ibérica (casos endógenos e importados), Região Oeste do Pacífico (casos importados da Austrália e Nova Zelândia), Ilhas do Caribe (casos em Guadalupe e Martinica importados do Haiti (**Román, G. *et al.***, 2000).

No Brasil existe uma predominância de 4,56 por 100.000 habitantes e freqüência aumentada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás (**Takayanagui, O. M. et Leite, J. P.** , 2001). A prevalência populacional desta neuroparasitose no Brasil não está bem definida. Os índices são aproximados, já que existem poucos casos notificados. O descaso quanto à recomendação do Ministério da Saúde (Portaria 1100, de 24/05/1996) faz com que os dados sobre incidência e prevalência da NCC sejam subestimados, distantes, portanto, da realidade. Ocorrência é suspeitada em áreas de suinocultura. Na literatura brasileira, os trabalhos regionais que descrevem aspectos polimórficos da doença constituem, a grosso modo, as informações sobre a NCC. A endemicidade nas duas últimas décadas foi evidenciada através de exame tomográfico computadorizado do crânio e dos vários segmentos da coluna vertebral (**Agapejev, S.** , 2003).

Os custos com a doença são altos, sendo o periodo médio de internação, nos casos complicados, em cerca de 18 dias. A faixa etária mais atingida varia nos indivíduos entre 21 e 40 anos de idade, ou seja, pessoas ativas na comunidade com prejuízo de suas funções profissionais. Em hospitais gerais, a taxa de mortalidade por NCC, varia em torno de 0,3%, em relação à outras nosologias, sendo considerada causa primária de óbitos em 27% e diagnóstico secundário em 26% dos casos nos estudos de necropsia (**Agapejev, S.** , 2003).

A prevalência da NCC no Brasil é subestimada, fazendo com que o complexo teníase-cisticercose permaneça endêmico e a NCC, patologia neglicenciada. Em 1996, a distribuição

da NCC no Brasil era conforme mostra a **Fig. 1.5.**, deixando em aberto extensa área do território nacional.

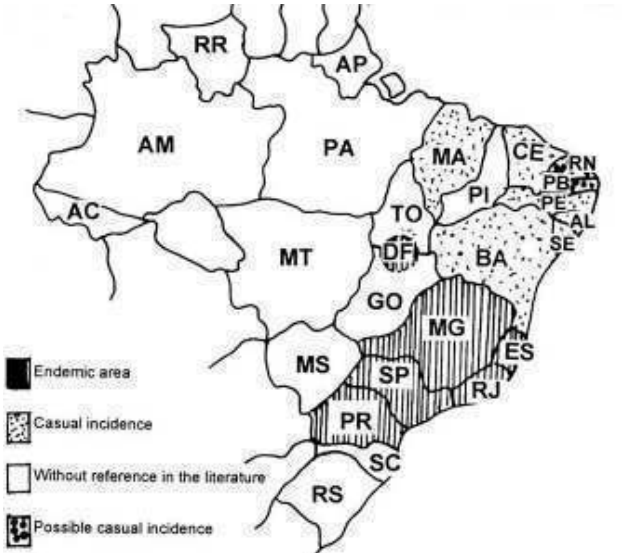


Fig. 1.5. - Distribuição da neurocisticercose humana no território brasileiro (**Agapejev, S.** , 1996).

1.2.4.2. Aspectos Biologicos

O parasita, conhecido como "solitária", pertence ao filo *Platyhemilthes*, classe *Cestoda*, ordem *Cyclophyllidea*, família *Taeniidae*, gênero *Taenia* e espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata*. As formas adultas do parasita *Taenia solium* e *Taenia saginata* (Tênia do porco e do boi respectivamente) produzem a teníase. As formas larvárias *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus bovis* produzem a cisticercose (**Rey, L.**, 1991). A classe *Cestoda* é subidividida nas ordens *Cyclophyllidea* e *Pseudophyllidea.* A ordem *Cyclophyllidea* é constituída por vermes de quatro ventosas.

Os Platelmintos são vermes com simetria bilateral, desprovidos de metamerização, com o corpo alongado e achatado no sentido dorso-ventral. A classe *Cestoda* é constituída exclusivamente por endoparasitas, de corpo segmentado, útero com ramificações laterais e

com poros genitais alternados, escoléx provido de ventosas e ganchos fixadores (*acúleos*). Os vermes adultos parasitam o tubo digestivo do único hospedeiro definitivo, o homem, e as formas larvárias parasitam os tecidos e vísceras do hospedeiro intermediário, o porco e o boi. Numerosas espécies parasitam o homem sendo as mais importantes a *Taenia solium, Taenia saginata, Echinococcus granulosus* e *Hymenolepis nana*. Na fase adulta o corpo das tênias é constituído por três porções: escoléx, colo e estróbilo. O escoléx ou cabeça é a porção anterior destinada a fixar a tênia na superfície interna da parede intestinal. É globoso, com cerca de um milímetro de diâmetro. A *T. solium* possui na sua porção apical um órgão ímpar e musculoso denominado *rostro* ou *rostellum* que é rodeado por quatro ventosas, a *T. saginata* não possui rostro. A *T. solium*, ao contrário da *T. saginata*, é conhecida como tênia armada, pois possui no seu *rostro* uma dupla coroa de vinte seis à vinte e oito ganchos quitinosos conhecidos como acúleos usados para fixar o verme no organismo do hospedeiro. O colo, ou pescoço, é a porção mais fina e não segmentada que liga o escoléx ao corpo. Na parte posterior do colo surgem sulcos transversais cuja evolução dá origem à segmentos denominados anéis ou proglotes. À este processo de evolução ou reprodução dá-se o nome de estrobilização. O estróbilo ou corpo é constituído por uma série de anéis ou proglotes cujo número varia de oitocentos à novecentos. Na parte anterior do estróbilo surgem as proglotes jovens ou imaturas, seguem-se as proglotes maduras e as grávidas cheias de ovos. As tênias não possuem sistema digestório sendo sua nutrição feita por endosmose, são animais hermafroditas, ou seja, se auto-fecundam e expulsam as proglotes grávidas em séries de três à seis, durante ou após a evacuação, sendo que a *T. solium* as expulsa passivamente, misturadas com as fezes (**Carrada-Bravo, T.** , 1987) (**Rey, L.**, 1991), e a *T. saginata* ativamente com movimentos perceptíveis pelo hospedeiro (**Huggins, D.** , 1989). O verme adulto possui dimensões distintas conforme a espécie. A *T. solium* mede de 3 à 5 metros e a *T. saginata* de 6 a 7 metros (**Fig. 1.6 e 1.7**).

A fase embrionária é determinada, no meio ambiente, pelo rompimento das proglotes, sendo liberado um grande número de ovos (*T. solium* – 30 a 50 mil e *T. saginata* – 80.000 por proglote). Em ambas as espécies as proglotes grávidas medem 1 cm de comprimento por 0,6 à 0,7 cm de largura. Um indivíduo parasitado contamina o meio ambiente com aproximadamente 700.000 ovos por dia (**Rey, L.**, 1992). Os ovos possuem de 30 à 40µm de diâmetro, casca de 3µm, são esféricos e contém no seu interior a oncosfera ou embrião hexacanto (**Molinari, J.L., Tato, P. Lara-Aguilera, R. White Jr, A.C.**, 1993) e se forem da *T. solium* possuem três pares de acúleos. Os ovos das duas espécies são praticamente indistinguíveis, possuem forma subesférica e medem de 30 à 40µm de diâmetro. A tabela 2.2. evidencia as principais diferenças entre as duas espécies de tênias.

Tabela 1.2. – Principais diferenças entre *T. solium* e *T. saginata* (**Alvarez**, G. G., 2000)

	Taenia solium	***Taenia saginata***
Escoléx	Globoso Com rostro Com dupla fileira de acúleos	Quadrangular Sem rostro Sem acúleos
Proglotes	Ramificações uterinas pouco numerosas, de tipo dendritico Saem passivamente com as fezes	Ramificações uterinas muito numerosas, de tipo dicotômico Saem ativamente no intervalo das defecações
Cisticercos	*Cysticercus cellulosae* Apresenta acúleos	*Cysticercus bovis* Não apresenta acúleos
Cisticercose Humana	Possível e comprovada	Controversa. Os autores têm diversas opiniões
Ovos	Indistinguíveis	Indistinguíveis

A casca do ovo tem a espessura de 3µ e é composta por bastonetes quitinosos impregnados de substância cálcica permitindo, desta forma, que o embrião fique viável no

meio ambiente úmido cerca de um ano. Ao ser deglutido, pelo hospedeiro intermediário (porco) ou acidental (humano) o ovo, por ação dos sucos digestivos, libera a oncosfera que atravessando a mucosa intestinal penetra na circulação linfática intestinal, circulação venosa e podendo, a partir daí, alcançar os vários tecidos e órgãos (**Figs. 1.6 e 1.7**).

A fase larvária da *Taenia solium*, é determinada pelo *Cysticercus cellulosae,* e o da *Taenia saginata* pelo *Cysticercus bovis* que morfologicamente apresentam-se como vesícula semi-transparente que contem em seu interior líquido vesicular e o escólex invaginado. No *Cysticercus cellulosae* o escólex invaginado forma um canal espiralado e rostro com quatro ventosas e dupla coroa de 24 à 32 acúleos. O corpo do parasita, invaginado na vesícula, é composto das camadas superpostas: cuticular, média (celular) e interna (muscular) sendo esta última a responsável pela evaginação do escólex que se faz por ação dos sucos biliares e do pH neutro.

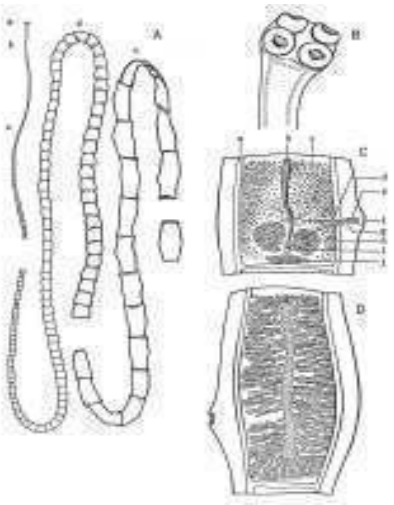


Fig. 1.6 – *Taenia saginata*. A- a. escolex b. colo c. proglotes jovens d. proglotes maduras e. proglotes grávidas. **B –** Escólex com ventosas. **C –** a. canal osmoregulador b. útero c. testículos d. canal deferente e. bolsa do cirro f. poro genital g. vagina h. ovário i. ootipo j. glândula vitelina **D –** proglote grávida.
(**Rey, L.** Parasitologia 3ª Ed.2001 p.426)

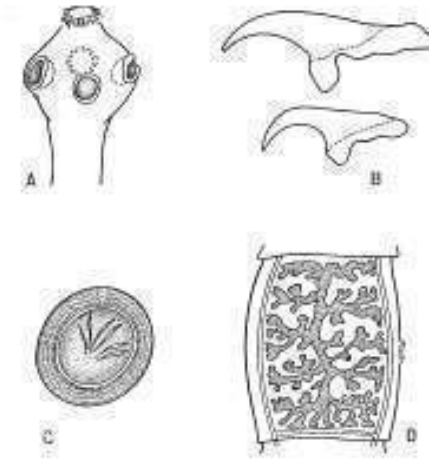


Fig. 1.7 – *Taenia solium*. A - escoléx armado **B –** acúleos **C –** ovo **D –** anel grávido.
(**Rey, L.** Parasitologia 3ª Ed.2001 p.428)

No tecido muscular da camada interna existe tecido conjuntivo frouxo onde se encontram os canalículos excretores diferenciados que se comunicam com o poro de invaginação (**Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., Cázares, J.M.L.,** 1990**)**. A morfologia e tamanho da vesícula vai depender da nutrição e do tecido ou órgão em que tenha se implantado. A vesícula pode ainda ser de forma alongada ou esférica medindo em média 10mm de diâmetro (**Molinari, J.L., Tato, P. Lara-Aguilera, R. White Jr, A.C.**, 1993). A membrana da vesícula é constituída de três camadas: tegumento, subtegumento e parênquima onde se encontra complexo sistema de canalículos em contato com o líquido vesicular que é constituído por glicose, proteínas e sais. A membrana é a porção da vesícula que protege o escólex e interage intimamente com o hospedeiro. Possui cerca de 70 à 100µm de espessura e microvilosidades que aumentam em média de 136 vezes a sua área total. As microvilosidades são estruturas importantes e estão relacionadas com o meio ambiente, alimentação, excreção e funções de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (**Molinari**, J.L., **Tato**, P., **Reynoso**, O.A., **Cázares**, J.M.L., 1990) (**Fig. 1.8**).

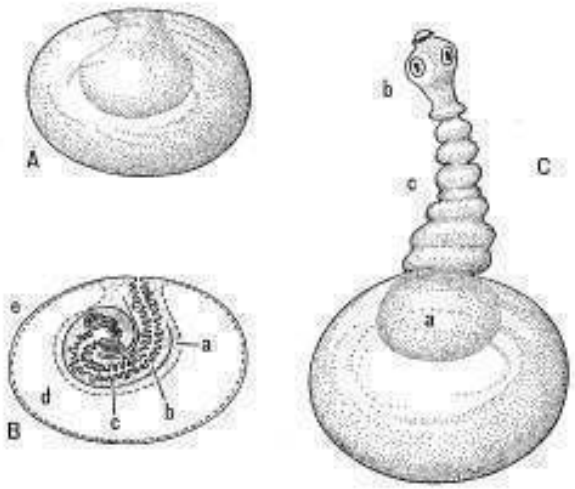


Fig. 1.8 – C*ysticercus cellulosae.*
A – Vesicula com escoléx invaginado
B – Vesicula em corte transversal a. *receptalum capitis* b. escolex invaginado c. vilosidades d. liquido hialino e. membrana do cisticerco. **C –** Cisticerco desinvaginado a. *receptaculum capitis* b. escoléx c. colo.
(**Rey, L.** Parasitologia 3ª Ed.2001 p.439)

A forma racêmica ou racemosa, *Cysticercus racemosus*, (**Fig. 1.9**) que geralmente é encontrada nos ventrículos e/ou cisternas basais cerebrais, parecer ser uma malformação ou degeneração do parasita. Não possui escólex, ou este é residual, apresenta as vesículas intercomunicantes e com ramificações e diâmetro de 40 à 120 mm.

A **B**

Fig. 1.9 A - Vesículas de *Cysticercus racemosus* retiradas dos ventrículos laterais. **B -** Cisticercos racemosos no espaço subaracnóideo da face anterior do tronco cerebral (autópsia). (http://anapat.unicamp.br/bineurocisticercose.html#racemoso).

1.2.4.3. Aspectos Imunológicos

A complexidade dos aspectos imunológicos decorre de uma vasta gama de fatores interrelacionados do binômio parasita-hospedeiro tais como: estágios de evolução dos antígenos parasitários e variações genéticas individuais que interferem na resposta do hospedeiro o que dificulta a compreensão da dinâmica de sobrevivência do parasita e dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os antígenos parasitários se classificam em estruturais, de superfície, de excreção e secreção, de estágio ou idade especificos. Os antígenos de superfície e os de excreção, interagem com o hospedeiro desde o inicio da infecção, outrossim, outros tipos de antígenos serão reconhecidos quando da degeneração do parasita (**Flisser, A., *et al.***, 1979).

Apenas os ovos da *Taenia solium* seriam infectantes para o humano. É muito raro outras espécies estarem envolvidas na cisticercose humana. A resposta do hospedeiro também

seria diferente; no suíno a cisticercose tende a ser disseminada com boa eficiência de estabelecimento do cisticerco o que sugere ser o porco o hospedeiro mais adequado. Na cisticercose humana o número de parasitas é menor, em 80% dos casos não são encontrados mais que cinco parasitas. Na NCC as alterações imunes extracelulares podem ser investigadas através do estudo do líquor cefalorraquiano (LCR), ou seja, as interrelações de caráter dinâmico que envolvem a barreira hemato-encefálica (BHE) e o leito vascular cerebral; a degeneração e morte do parasita pode culminar com quadro clinico meningítico, liberação maciça de antígenos e exacerbação da resposta imune detectada no LCR (**Flisser, A.** , 1997).

A forma larvária da tênia pode sobreviver por meses ou anos, no hospedeiro, sem alterações significativas, através de mecanismos de escape da defesa do hospedeiro. À medida que evolui, o cisticerco entra em processso degenerativo sendo seus antígenos reconhecidos pelo sistema imune dando origem aos quadros clinico e sintomatológico do hospedeiro. No humano as formas evolutivas do parasita foram bem delineadas através da imagenologia (Tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) e exames anatomopatológicos e consistem de: fases de vesícula ou cisto (parasita sem alterações), fase coloidal (cápsula de tecido conjuntivo do hospedeiro envolvendo o cisto, líquido vesicular gelatinoso, escólex granuloso), fase nodular (escólex envolto por reação inflamatória, hialinização e infiltração de cálcio) e fase nodular calcificada (nódulo reduzido e calcificado) (**Aluja, A., Vargas, G.** , 1989).

Na NCC, a resposta imunológica do hospedeiro, no parênquima cerebral e no LCR, é, inicialmente, do tipo Th1 levando à reação citotóxica e morte do parasita. Nas fases mais avançadas vai haver predomínio da resposta Th2, com a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10), com modulação da resposta inflamatória e ativação policlonal (**Rodrigues Jr, V., *et al.***, 2000).

Para a prolongada sobrevida no sistema nervoso central (SNC), o *Cysticercus cellulosae* utiliza de mecanismos parasitários de evasão que são: mascaramento da membrana parasitária com adsorção de proteínas do hospedeiro, mimetismo molecular, variação e expressão antigênica do parasita, indução de supressão ou de tolerância imune e local privilegiado do SNC. O *Cysticercus cellulosae* possui a capacidade, por mecanismos ainda não bem esclarecidos, de adsorver imunoglobulinas do hospedeiro em sua superfície. Pode também neutralizar lesões de membrana por efeito de complemento, impedindo a ruptura do controle de permeabilidade. O ácido siálico presente na membrana pode neutralizar C3b que é detectado na superfície da vesícula (**Grau, E., Garrido, F., Cañedo, L.** , 1982). Uma outra hipótese é a produção de substâncias parasitárias indutoras de alterações linfocitárias e de tolerância no hospedeiro. Produtos de excreção do parasita inibem a degranulação de mastócitos murinos *in vitro* e *in vivo* (**Rey, L.** , 1991). O antígeno B, detectado no tegumento e canal espiralado do *Cysticercus cellulosae*, é outro produto de excreção que ao ser liberado induz a formação de imunocomplexos nos tecidos do hospedeiro com consumo do complemento e lesões teciduais desviando a ação do sistema imune para longe do parasita. Um outro mecanismo de evasão seria a afinidade do antígeno B por colágeno, auxiliando, portanto, na formação de cápsula em torno do parasita. A produção, pelo cisticerco, de Paramiosina, de Taeniaestatina e do Fator Metacestóide lhe permite sobreviver à reação imune do hospedeiro (**Del Brutto, O.H.**, 1999). A Paramiosina e a Taeniaestatina inibem a ativação do sistema complemento, sendo que, a última ainda inibe a regulação das funções leucocitárias do hospedeiro. O Fator Metacestóide reduz a produção das citocinas IL-2, IL-4 e do interferon gama (IFN-γ), e a estimulação dos macrófagos pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), com queda na regulação da reposta imune Th1, Th2 e das citocinas pró-inflamatórias (**Rodrigues Jr, V., *et al.***, 2000).

1.2.4.4. Manifestações Clínicas

A cisticercose pode causar diferentes quadros clínicos dependendo da localização anatômica e da reação imunológica do hospedeiro. As manifestações clinicas da NCC são muitas e inespecíficas, não configurando um quadro sindrômico típico e sim um pleomorfismo de sinais e sintomas (**Garcia, H. H., Del Brutto, O. H.**, 2000). Na NCC, os cisticercos podem ser encontrados na forma ativa provocando aracnoidite, hidrocefalia por obstrução na comunicação dos ventrículos encefálicos, inflamação meningea, cistos parenquimatosos, enfarte cerebral; ou na forma inativa com a formação de granulomas calcificados parênquimatosos ou hidrocefalia secundaria à fibrose subaracnoidea. Os sinais/sintomas mais comuns da cisticercose na forma encefálica são; epilepsia, cefaleia, papiledema, vômitos, sinais de comprometimento de funções cognitivas, sensoriais e/ou motoras. O enfarte cerebral lacunar que é a complicação cerebrovascular mais comum na NCC é resultado da oclusão arterial secundária a intensa reação inflamatória dentro do espaço subaracnóide, também já foram descritos casos de grandes enfartes. Aracnoidite pela cisticercose é associada, em alguns casos, com a hidrocefalia.

As formas infectantes na NCC são: a cística (globóide), mais comum, com líquido vesicular transparente e o escólex invaginado (*Cysticercus cellulosae*), possui em média de 5 à 8 mm podendo atingir até 10 cm constituindo-se em um macrocisto. Em algumas ocasiões, especialmente no espaço subaracnoide das cisternas basais e nos ventrículos infra e supratentoriais, tem sido descrita uma variedade cística multilobulada, sem o escoléx, denominada de *Cysticercus racemosus*, que parece ser uma variante em degeneração, podendo atingir de 3 à 10 cm.

Finalmente, após completar o seu ciclo vital, o cisticerco degenera, morre culminando na formação de um granuloma calcificado. À medida que o parasita gradativamente degenera

e morre há hialinização progressiva, o cisto torna-se opalescente e diminui de volume. Surge necrose gradativa e formam-se sinéquias fibrilares, inclusive nos ventrículos. Nesta fase de morte cística o sistema imunológico do hospedeiro reage com maior intensidade surgindo concentrações maiores de antígenos e de imunocomplexos. Os fenômenos exsudativos e inflamatórios, que então surgem, são os responsáveis pela vasculite, ependimite, meningite e encefalite que podem dar origem à fenômenos de natureza obstrutiva vascular ou liquórica. O edema encefálico, sempre presente, é fator agravante culminando com síndromes hipertensivas intracranianas associadas à hidrocefalia.

As mais comuns das manifestações clinicas da NCC são as crises epilépticas (**White, A.C. Jr.**, 1997) que podem ser focais, focais com generalização secundária e generalizadas. Pacientes com crises quase sempre tem evidencias de comprometimento do parênquima encefálico causado pelo próprio cisticerco e pelo edema associado. Estas alterações geralmente estão associadas à fase ativa coloidal, ou granulo-nodular, de evolução do cisticerco. Na fase inativa da NCC, com calcificações nodulares do parênquima encefálico, fase nodular calcificada, pode haver recorrência dos episódios convulsivos geralmente associados à retirada do fármaco anti-epiléptico (FAE). O exame eletroencefalográfico (EEG), nas fases ativa e inativa da doença, pode evidenciar anormalidades focais que requerem tratamento com FAE. Na fase inativa não existem evidencias que as lesões calcificadas estejam associadas com parasitas viáveis, por outro lado os granulomas calcificados poderiam estar liberando antígenos que estimulariam a resposta imune do hospedeiro desencadeando os episódios convulsivos (**Del Brutto, O.H., Santibañez, R., Noboa, C.A., *et al.***, 1992).

As cefaléias, hemi ou holocranianas, são queixas comuns na NCC parenquimatosa, ventricular e das cisternas basais do encéfalo (**Del Brutto, O.H., Sotelo, J., Roman, G.C.**, 1998). Podem ser confundidas com enxaquecas ou cefaléias de tensão. A cefaléia na NCC

costuma ser o sinal indicativo inicial da síndrome de hipertensão intracraniana (SHI) devido ao edema cerebral. A associação de NCC parenquimatosa com cefaléia sugere envolvimento vascular ou vasculite quando a NCC é cisternal (**Cruz, M. E., Cruz, I., Preux, P. M., *et al***, 1995).

Sinais e sintomas de hipertensão intracraniana na NCC podem ser confundidos com outras morbidades como neoplasia e abcessos cerebrais. Os principais sinais da hipertensão intracraniana são a rigidez de nuca e o papiledema. Nos sintomas podem estar incluídos: a náusea, vômitos, tonturas, sonolência, estado mental alterado e alterações visuais (**Bandres, J., White, A. C., Samo, T.** et al., 1992). Em geral a SHI resulta, além da forma parenquimatosa com formação de edema e aumento do volume cerebral, da NCC extraparenquimatosa, racemosa, com hidrocefalia comunicante (cisternal) ou obstrutiva (ventricular) (**Estañol, B., Kleriga, E., Loyo, M., et al.**, 1983).

Transtornos cognitivos podem ser observados em pacientes com NCC (**Levav, M., *et al.*** , 1995). As dificuldades do aprendizado em um determinado grupo de crianças pode ser devido à NCC, bem como, em adultos, os quadro depressivos, psicóticos e demenciais (**Forlenza, O.V., Filho A. H. G. V., Nobrega, J. P. S., *et al.***, 1997). Por outro lado, alterações do estado mental de forma aguda usualmente pode refletir crises epilépticas parciais continuas ou hidrocefalia o que remete ao diagnóstico diferencial com NCC. Estado mental alterado que não resolve, ou não melhora, após episódio convulsivo usualmente pode ser devido à hidrocefalia (**Shandera, W. X., White, A. C. Jr., Chen, J., *et al.***, 1994).

A cisticercose oftálmica ocorre somente em torno de 1 à 3% das infecções. Entretanto, sua importância clinica não pode ser subestimada pois provoca disfunção de importante órgão neurossensorial. Os olhos formam-se à partir de evaginações, que vão dar origem à vesículas ópticas, de ambos os lados do encéfalo anterior no fim da quarta semana do desenvolvimento

fetal. Em seguida, as vesículas ópticas sofrem invaginações que vão formar as camadas pigmentar e neural da retina (**Sadler, T. W.**, 2001). Como grande parte do globo ocular é formada por tecido nervoso, a cisticercose oftálmica é considerada infecção que afeta o sistema neural, ou seja, NCC. Frequentemente, através da biomicroscopia utilizando a lâmpada de fenda, os cistos são vistos flutuando livremente no humor vítreo, no espaço subrretinal (correspondente ao espaço subaracnóideo) como também na câmara anterior do globo ocular, na conjuntiva ou nos músculos extraoculares. Em alguns pacientes com infecção maciça pode haver cistos nos espaços; retro-ocular, com comprometimento do nervo óptico, proptose e disfunções optoquiasmáticas (**Wadia, N., Desai, S., Bhatt, M.**, 1988). Todas estas localizações dos cistos levam à transtornos funcionais da visão (**Fig. 1.10).**

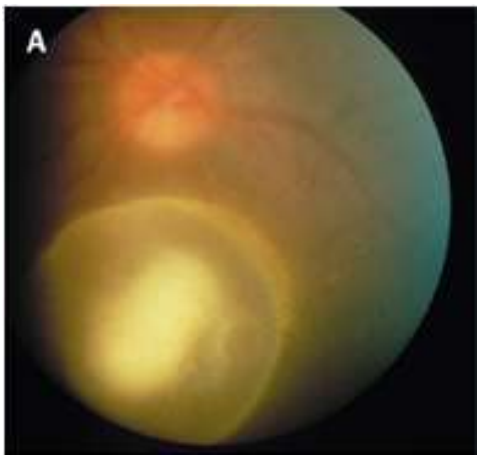


Fig. 1.10 – Cisticercose ocular. Localização de um cisto na câmara posterior do olho (humor vítreo). (Costa, F.A.O. J. Epilepsy Clin. Neurophysiol. 2007; 13(4):183-185)

A forma raquidiana da cisticercose do SNC é pouco freqüente em relação à forma encefálica (1,6% à 2,7% dos casos) (**Colli, B. O., Valença, M.M., Carlotti Jr, C.G., *et al.*** , 2002). O cisticerco alcança o canal raquidiano através da circulação sanguinea arterial ou através do LCR do espaço subaracnóideo. A via sanguinea é a mais freqüente fonte de infestação intramedular enquanto a via subaracnóidea seria a da extramedular (**Trelles, J. O., Cáceres, A., Palomino, L.**, 1970). Pode afetar todos os segmentos da coluna vertebral: cervical, torácico, lombar e sacral, comprometendo as estruturas medulares, meningeas,

radiculares e o arcabouço ósseo raquiano (**Fig. 1.11**). As manifestações clinicas da cisticercose raquidiana são aquelas relacionadas com sinais de compressão da medula, das raízes neurais e da cauda eqüina tais como: paresias ou plegias flácidas, arreflexas e espasticas, transtornos sensitivos, esfincterianos, dores irradiadas em faixa (geralmente seguindo a trajetória da raiz comprometida), sinais meningo-radiculares e de liberação piramidal (reflexos superficiais e profundos anômalos) (**Honda, P.M., Coelho, M.G.** , 1986). As manifestações não tem especificidade, determinam síndromes de compressão de estruturas e reações inflamatórias, e podem ser confundidas com outras morbidades como doenças degenerativas - esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, neurossifilis (*tabes dorsalis*), radiculopatias e neoplasias. Além dessas, podem haver outras manifestações de comprometimento encefálico em razão da associação comum entre as formas cerebral e raquidiana da NCC (**Colli, B. O., Valença, M.M., Carlotti Jr, C.G., *et al.*** , 2002).

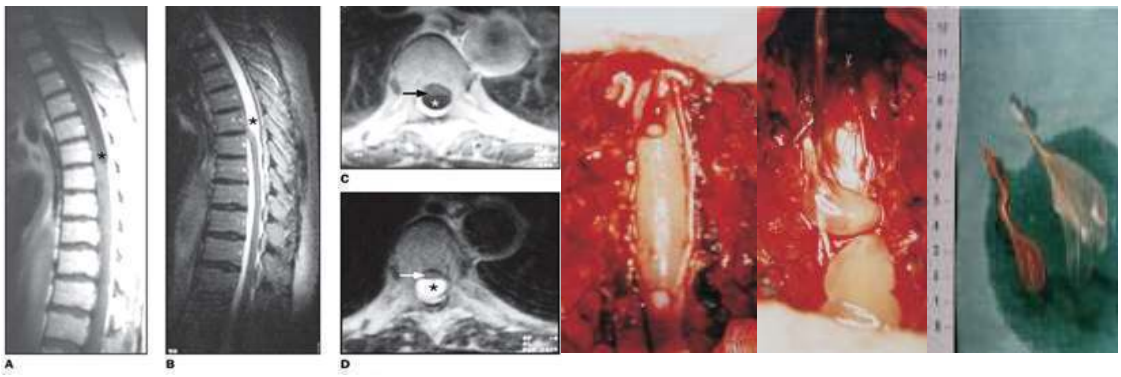


Fig. 1.11 – Ressonância magnética da coluna dorsal. Plano sagital: A-sequência ponderada em T1 e B-sequência ponderada em T2 evidenciando cistos aglomerados (asterisco). Plano axial: C-sequência ponderada em T1 e D-sequência ponderada em T2 evidenciando os cistos aglomerados (asterisco) comprimindo a medula dorsal (seta). Aspecto cirúrgico (da esquerda para a direita): abertura da dura-mater evidenciando os cistos aglomerados, remoção individual dos cistos e cistos removidos.
(**Rossi, L.A., *et al.*** Radiol. Bras., 2006; 39(5):379–382)

Concluindo, no comprometimento do sistema neural pela NCC, existem formas que cursam com manifestações clínicas, neurológicas e psiquiátricas, enquanto outras evoluem com ausência de quaisquer manifestações de sinais e sintomas sendo diagnosticadas, casualmente, através de exames laboratoriais, de imagem, biópsias e necrópsias.

1.2.4.5. Etiopatogenia

A cisticercose é conhecida de longa data, entretanto seu ciclo biológico somente foi esclarecido em 1855. O agente etiológico é a larva da *Taenia solium*, o *Cysticercus cellulosae*. Os principais meios de propagação são; através da heteroinfecção pela ingestão acidental dos ovos da *Taenia solium* em água e alimentos contaminados e práticas sexuais orais, ou através da autoinfecção externa em indivíduos portadores de teníase, com maus hábitos de higiene, ou da autoinfecção interna, de aspecto controverso, conseqüente ao refluxo das proglótides grávidas para o estômago.

Os ovos ingeridos tem sua casca digerida no ambiente gástrico e evoluem para larvas conhecidas como oncosferas, que contem em seu interior o embrião hexacanto. As larvas penetram ativamente a mucosa intestinal, chegam às circulações sanguinea e linfática disseminando pelo organismo, podendo parasitar qualquer órgão. No SNC (encéfalo e medula) podem adquirir duas formas distintas: a cística vesicular com o escoléx invaginado parasitando o parênquima encefálico e medular e cística racemosa, sem escoléx, em forma de cachos de uva, podendo atingir grandes diâmetros (cistos gigantes), parasitando ventrículos, cisternas cerebrais e espaço subaracnóideo cerebral e medular. O cisticerco, assim alojado, pode permanecer viável por longo tempo, até vários anos, devido aos mecanismos de evasão do parasita e de tolerância do sistema imunológico do hospedeiro. Após período variável de tempo o cisticerco entra em degeneração devido a ativação do sistema imune do hospedeiro no que resulta os sinais e sintomas de caráter inflamatório. Evidenciam-se, assim, quatro estágios na evolução do cisticerco: estágio de cisto viável e os estágios degenerativos coloidal, grânulo-nodular e calcificado (**Escobar, A.** , 1983). Na NCC a elevada gama de sinais e sintomas são devidos à reação inflamatória meningea e parenquimatosa, isquemia do tecido cerebral devido à vasculite, efeito de massa pelo cisticerco sobre as estruturas neurais e bloqueio da circulação do LCR devido à obstrução ventricular ou cisternal pela forma

racemosa que sempre tem índices elevados de mortalidade por causa de sua associação com hidrocefalia obstrutiva (**Bickerstaff, E.R., Cloake, P.C.P., Hughes, B., *et al.***, 1952).

1.2.4.6. Diagnóstico

Na NCC, as manifestações clinicas por serem inespecíficas não permitem, por si só, o diagnóstico da doença. Como não existem sinais patognomônicos da doença, a suspeita diagnóstica deve ser baseada e confirmada através dos antecedentes epidemiológicos, dos dados clínicos-laboratoriais, da imagenologia e eventualmente na observação cirúrgica. Dentre os dados laboratoriais, testes sorológicos podem ser aplicados em humanos e suínos para estudos epidemiológicos e para o diagnóstico da NCC em humanos. A infecção pela *Taenia solium* resulta em resposta imune mediada por anticorpo especifico, principalmente da classe IgG. Em alguns indivíduos a resposta pode ser mediada através de anticorpos IgM, IgA e IgE (**Goodman, K., Carpio, A., Ballagh, S.A.**, 1997). Estas diversidades de respostas nestes indivíduos podem ser devidas às mudanças qualitativa e quantitativa na excreção e secreção de antígenos somáticos liberados durante as várias fases de desenvolvimento do parasita (**Schantz, P.M.** , 1996).

O exame de rotina do LCR é um dos meios importantes para o diagnóstico da cisticercose cerebral *in vivo*. Geralmente as alterações liquóricas observadas são: pleocitose (polimorfonucleares e linfócitos) discreta à moderada em 50% à 100% dos casos, eosinofilorraquia acima de 2% do número total de células, ou seja, 40% à 87% dos casos, hiperproteinorraquia em torno de 30% à 75% dos casos, hipoglicorraquia em 17% à 80% dos casos.

As reações de imunodiagnóstico; reação de fixação do complemento, hemaglutinação, imunofluorescência indireta, imunoeletroforese e o ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA – *enzime-linked immunosorbent assay*) indicam (49% à 62%) a presença de

anticorpos específicos anticisticercos no LCR (**Takayanagui, O.M., Jardim, E.** , 1983). Entretanto, exames feitos no LCR podem ser normais em 20% à 25% dos casos e nos pacientes com SHI os riscos de herniações das estruturas encefálicas constituem fatores limitantes à punção liquórica no segmento lombo-sacro da coluna vertebral. Uma opção seria a realização, no soro, do teste de imunoeletrotransferência (EITB). Os antígenos utilizados nestes testes podem ser os que estão contidos no líquido das vesículas cisticercóticas ou no extrato bruto do parasita *Taenia solium*. Alguns autores tem utilizado o extrato bruto da *Taenia crassiceps* devido a facilidade de manter este parasita em ratos de laboratório (**Pardini, A.X., *et al.***, 2002). Entretanto, estes antígenos não purificados tem apenas moderada sensibilidade e pobre especificidade (**Fleury, A., *et al.***, 2001). Em algumas espécies heterologas, como os da *Taenia solium* e da *Taenia crassiceps*, foram observados que parte dos antígenos comuns à ambas as espécies, são glicoproteínas que podem também serem úteis no diagnóstico da NCC, criando assim alternativas à substituição do antígeno homologo da *Taenia solium* muitas vezes de difícil obtenção. Na eletroforese, inclusive, visualizam-se bandas de pesos moleculares semelhantes dos antígenos dos *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus longicollis*, formas larvárias da *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*, respectivamente.

Pesquisas das propriedades antigênicas dos liquidos vesiculares e de glicoproteinas associadas à superfície e melhora das técnicas de purificação resultaram em testes sorológicos bastante confiáveis. O teste de imunoeletrotransferência, IMUNOBLOT (EITB – *enzime-linked immunoelectrotransfer blot assay*), de sete glicoproteinas do cisticerco, purificado através da cromatografia da *lentil lectin-purified*, no soro, tem especificidade próximo à 100% e sensibilidade de 70% à 90%, em pacientes com duas ou mais lesões ativas intracranianas (**Tsang, V. C., *et al.***, 1989). Se a lesão for única (um único cisticerco intracraniano) estes índices se reduzem à 28% (**Wilson, M., *et al.***, 1991). No liquor, a sensibilidade e

especificidade deste teste são, paradoxalmente, bem menores em relação ao exame feito no soro. O EITB, apesar da sua alta sensibilidade e especificidade quando feito no soro, possue fatores limitantes tais como não ser sensível e especifico em caso de lesão única, técnica relativamente complexa e o alto custo o que inviabiliza a sua realização nos países em desenvolvimento.

Os métodos diagnósticos por imagem foram inicialmente realizados através das radiografias simples do crânio, da cisternografia, da ventriculografia com contraste positivo, das arteriografias e pneumoencefalografias, técnicas que foram quase totalmente substituídas pela tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM). A radiografia simples do crânio evidencia as lesões quando estas estão calcificadas (**Canelas, H.M.**, 1962), entretanto, devido à sua baixa positividade e especificidade deixou de ser um exame importante após a introdução da TC. As imagens ventriculográficas, que sugerem o diagnóstico, numa área endêmica, foram agrupadas em tres tipos: obstrução parcial ou total dos ventrículos pelo cisticerco, obstrução inflamatória do sistema ventricular (geralmente localizada no quarto ventrículo ou no aqueduto cerebral) e obstrução inflamatória com a presença do cisticerco no interior dos ventrículos. As alterações tomográficas sugestivas de NCC estão na dependência da fase de desenvolvimento da larva. As lesões císticas hipodensas, de contornos bem delimitados, e geralmente com o escoléx no seu interior, corresponde ao cisticerco vivo e portanto à fase ativa (**Sotelo, J., Guerrero, V., Rubio, F.**, 1985). A lesão hipodensa com reforço hiperdenso em anel ou lesão isodensa com reforço homogêneo na fase contrastada indica a fase degenerativa do cisticerco. A lesão hiperdensa, indica a morte e calcificação do cisticerco. O tempo médio entre a morte do cisticerco e a calcificação perceptivel radiologicamente é de 25 meses (**Machado, L.R., *et al.***, 1990).

Os métodos de imagenologia (TC e RNM), por auxiliarem no aumento da acurácia diagnóstica, constituem o padrão-ouro dos testes diagnósticos na NCC. Demonstram de

maneira objetiva e precisa a topografia das lesões e o grau de atividade inflamatória (**Fig. 1.12)**.

A **B** **C**

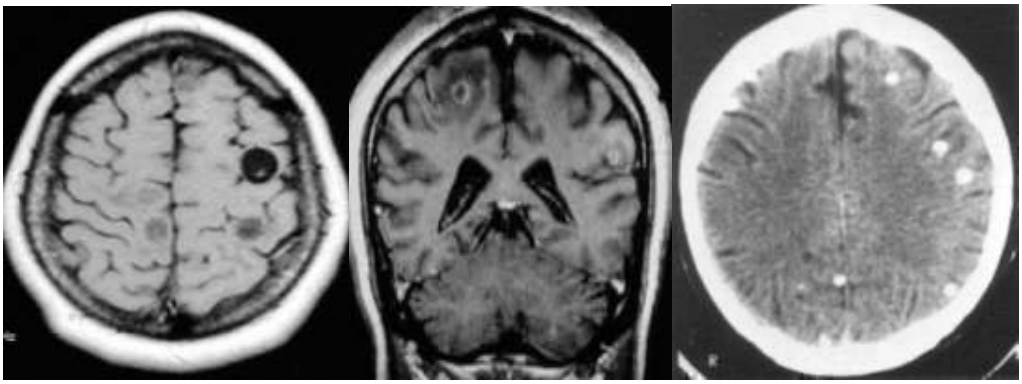
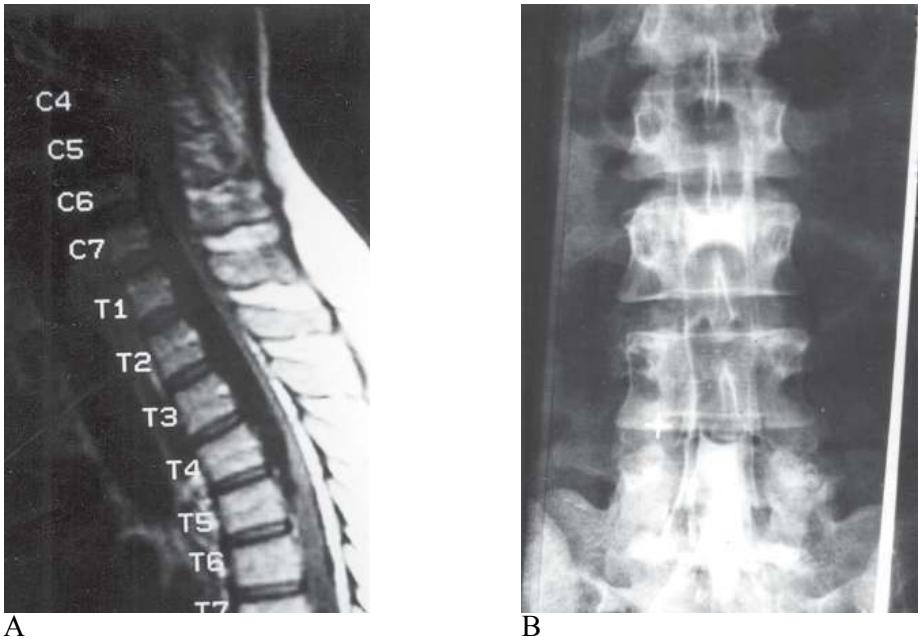


Fig. 1.12 - Imagenologia da NCC nos diferentes estágios. A – Cisto viável (RNM), B – Cisto em fase degenerativa (RNM) e C – Granuloma calcificado (TC). (**Bittencourt, P.C.T.**, *et al*. Neurocisticercose – www.neurologia.ufsc.br)

A eletroencefalografia (EEG), exame funcional do SNC, não tem muita aplicação como método diagnóstico na NCC, podendo exibir alterações focais, generalizadas ou ser completamente normal. A identificação, pelo EEG, de uma área epileptogênica pode, ou não, estabelecer uma correlação entre a topografia e a identificação da lesão subjacente.

Em contraste com NCC cerebral, a cisticercose raqudiana apresenta escassa informação de achados de imagem. A TC evidencia, na cisticercose intramedular, alargamento simétrico e cístico do setor medular acometido e formações pseudoreticulares dentro do canal raqueano no individuo com cistos leptomeningeos. Na RNM, o cisticerco intramedular aparece como lesão arrendonda ou septada que pode ter no seu interior um nódulo excêntrico e hiperintenso representando o escoléx. A periferia do cisto geralmente apresenta realce hiperintenso (RNM) ou hiperdenso (TC) devido à quebra da barreira hematoencefálica (BHE) do parênquima medular circunjacente ao cisto. Quando o escoléx não é visualizado torna-se difícil fazer a diferença entre NCC e as neoplasias medulares (ependimomas e astrocitomas císticos) e as cavidades siringomiélicas primárias

(**Venkataramana, N.K.,** ***et al.***, 1989) (**Fig. 1.13A**). Nos pacientes com suspeita de cisticercose leptomeningea espinhal a mielotomografia contrastada é de grande valor. Nesta forma de cisticercose os mielogramas, usualmente, mostram múltiplas falhas de preenchimento na coluna de contraste e que correspondem aos cistos leptomeningeos que podem mudar de posição durante o exame de acordo com os movimentos do paciente (**Fig. 1.13B**).



A B

Fig. 1.13 A – RNM sagital do segmento dorsal da coluna vertebral evidenciando área hipointensa no canal raquidiano de C4 à T5 sugestiva de vesícula cisticercótica. **B** – Mielotomografia do segmento lombossacro da coluna vertebral evidenciando área de subtração ovalada sugestiva de cisticerco no espaço subaracnóideo.
(**Colli, B.O., Carlotti Jr., C.G.** Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da cisticercose do SNC. 2003, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP).

Devido às incertezas e dificuldades diagnósticas foram propostos determinados critérios diagnósticos para orientarem o tratamento e pesquisa cientifica na NCC. Critérios estes baseados nos dados clínicos-laboratoriais, de imagem, patológicos e epidemiológicos (**Del Brutto, O. H.,** ***et al.***, 2001) (**Tabelas 1.3 e 1.4**)

1.2.4.7. Diagnóstico Diferencial

A NCC é uma condição com manifestações polimórficas que podem mimetizar qualquer enfermidade que acometa o SNC tornando-se, pois, necessário fazer diagnóstico diferencial com outras patologias, utilizando testes apropriados quando dúvidas persistirem.

Tabela 1.3 – Critérios diagnósticos para a NCC. (Modificado de Del Brutto *et al*, 2001).

Critérios	**Observações**
Absolutos	Demonstração histológica do parasita através de biópsia da lesão cerebral ou medular Parasita visualizado em biomicroscopia (fundoscopia) Lesão cística com escoléx no seu interior evidenciada pela TC ou RNM
Maiores	Evidência de lesões fortemente sugestivas de NCC na TC ou RNM Sorologia positiva para pesquisa de anticorpos anticisticercos (EITB) Resolução de lesões císticas intracranianas após tratamento com antiparasitários Resolução espontânea de lesões únicas e pequenas com realce
Menores	Lesões compatíveis com NCC na TC ou RNM Manifestações clínicas sugestivas de NCC ELISA positivo para anticorpos anticisticerco ou antígenos do cisticerco Cisticercose fora do SNC
Epidemiológicos	Indivíduos oriundo ou vivendo em áreas endêmicas para a NCC Relato de viagens freqüentes para áreas endêmicas de NCC Evidencia de um contactuante próximo com infecção por NCC

De acordo com os critérios da tabela acima podem ser inferidos os diagnósticos definitivo e provável de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1.4. – Diagnósticos definitivo e provável de acordo com os critérios diagnósticos para NCC. (Modificado de Del Brutto *et al*. 2001)

Diagnóstico	**Critérios**
Definitivo	1 Critério absoluto 2 Critérios maiores + 1 critério menor + 1 critério epidemiológico
Provável	1 Critério maior + 2 critérios menores 1 Critério maior + 1 critério menor + 1 critério epidemiológico 3 Critérios menores + 1 critério epidemiológico

O diagnóstico diferencial entre a NCC e outras doenças parsitárias pode ser difícil e é feito com base nas características epidemiológicas, dados de neuroimagem e testes imunológicos de alta especificidade. Uma doença rara mas que pode perfeitamente simular a NCC é a cenurose causada pelo cestóide *Multiceps multiceps* (**Garcia, H.H., *et al.***, 2002).

Tabela 1.5. – Diagnóstico diferencial entre alguns tipos de patologias e a NCC

Neuroinfecções	(Tuberculose, toxoplasmose, criptococose, hidatidose)
Colagenoses	(Lupus Eritematoso Sistêmico)
Neoplasias	(Primitivas ou metastáticas do SNC)
Abcesso cerebral	
Esclerose Múltipla	
Malformações Vasculares Cerebrais	(Malformações arteriovenoas, cavernomas)
Malformações Congênitas	(Cisto aracnóde, cisto porencefálico)

Tabela 1.6. – Diagnóstico diferencial da NCC em neuroimagem

Neuroimagem	**Patologias**
Lesão cística isolada sem realce	Cisto hidático
	Cisto aracnóide
	Porencefalia
	Astrocistoma cístico (terceiro ventrículo)
Lesões císticas difusas sem realce	Metástases múltiplas
	Cisto hidático (raro)
Lesões com realce	Tuberculose
	Micose
	Toxoplasmose
	Abcesso de cisto colóide
	Estágios iniciais de gliomas
	Metástase única
	Malformação arterio-venosa
Calcificações patológicas	Esclerose Tuberosa
	Tuberculose
	Infecção por citomegalovirus
	Toxoplasmose
	Calcificações dos núcleos basais
Calcificações não patológicas	Calcificação do plexo coróide
	Calcificação da foice cerebral
	Calcificação da glândula pineal

As tabelas 1.5 e 1.6, acima, listam, respectivamente, os principais tipos de patologias e achados em neuroimagens associadas à patologias as quais devem ser feitos os diagnósticos diferenciais com a NCC.

1.2.4.8. Tratamento

O tratamento da NCC é baseado na patogênese e manifestações clínicas da doença (grau de reposta do hospedeiro). O *Cysticercus cellulosae* tem tropismo pelos tecidos subcutâneo, muscular, ocular e neural, onde evolue para a forma cística, podendo ficar quiescente por meses ou anos. A degeneração dos cistos, de forma espontânea ou induzidas por drogas parasiticidas, geralmente é acompanhada por reação inflamatória, fibrose e posteriormente calcificação. A agressão ao SNC é feita através de três modos; pela presença do parasita no parênquima cerebral ou medular (NCC parenquimatosa), ou nos espaços liquóricos (subaracnóideo, cisternas e ventrículos – NCC extraparenquimatosa) e o processo inflamatório decorrente, ou pela formação de fibroses, granulomas e calcificações. Estes três modos de agressão dependem do número, tipo e localização dos cistos, além da resposta imunológica do hospedeiro (**Flisser, A., *et al.***, 1979). A resposta imune inata e adquirida na NCC, destacam as condições que parecem ser favoráveis à sobrevivência ou destruição do parasita e para o beneficio ou prejuízo do hospedeiro (**Sciutto, E., *et al.***, 2007). Assim as diversas formas de apresentação da doença tem tratamentos distintos. A cisticercose fora do SNC não apresenta sinais e sintomas exuberantes e geralmente carece de tratamento.

As drogas parasiticidas utilizadas para o tratamento da NCC humana são: o Praziquantel, largamente utilizada desde o inicio dos anos oitenta, e o Albendazol, agente antihelmintico de amplo espectro de ação contra várias espécies de nematódeos e cestódeos.

O Praziquantel (na dosagem de aproximadamente 50 mg/kg/dia em 3 doses diárias durante 14 dias, podendo-se chegar, seguramente, à 100 mg/kg/dia) é bem absorvido quando administrado via oral e o seu metabolismo é induzido por FAE, tanto quanto por

corticosteróides (**Vasquez, M.L., *et al.***, 1987) (**Bittencourt, P.R., *et al.***, 1992) e inibido por cimetidine na dosagem de 400 mg 3 vezes ao dia. Os principais efeitos adversos ao uso do Praziquantel são: cefaléias, vertigens, , crises convulsivas e SHI que acredita-se serem causados pela resposta inflamatória do hospedeiro à degeneração e morte do parasita. Baseados nestas observações, certos autores, recomendam o uso concomitante de corticosteróides ou imunossupressores junto com as drogas parasiticidas (**De Ghetaldi, L.Dl, et al.**, 1983). Outros autores, argumentam que o uso rotineiro de corticosteróides poderia diminuir a eficácia do parasiticida.

O antihelmintico Albendazol, é bem absorvido oralmente e possui também amplo espectro de ação frente à muitas espécies de nematódeos e cestódeos. Os efeitos adversos são semelhantes aos do praziquantel, porém, com menor intensidade. Em doses de 15 mg/kg/dia divididas em duas tomadas demonstraram redução no número e tamanho dos cisticercos parenquimatosos (**Escobedo, F., *et al.***, 1987). Estudos comparativos sugerem respostas tão boas ou melhores do que as experimentadas com o Praziquantel (**White, A.C. Jr.**, 1997).

Alguns estudos mostraram respostas similares, ao uso de drogas parasiticidas, utilizando apenas drogas sintomáticas (**Kramer, L.D., *et al.***, 1989). Uma revisão sistemática, (Biblioteca Cochrane) concluiu não haver evidencias claras que o uso de drogas parasiticidas na NCC parenquimatosa tenham a mesma eficácia que nos casos não tratados (**Salinas, R., Prasad, K.** , 1999).

Para o gerenciamento adequado da terapêutica considera-se duas formas distintas de NCC: As formas inativa e ativa da doença. Pacientes com a forma inativa da NCC parenquimatosa, apesar de possuírem risco elevado para epilepsia secundária com crises convulsivas recorrentes, não tem indicação para tratamento com drogas parasiticidas (**Del Brutto, O.H.** , 1994) e sim de fármacos anti-epiléticos (FAE) para evitar a recorrência dos

episódios convulsivos. Entre os FAE mais utilizados estão; fenitoína, fenobarbital e carbamazepina.

Ainda na fase inativa, em alguns pacientes, a hidrocefalia pode ser uma complicação tardia da NCC do espaço subaracnoide, cisternal ou ventricular (NCC extraparenquimatosa). Neste caso o tratamento é quase sempre cirúrgico (derivação ventrículo-peritoneal com implantação de válvula de média pressão), para aliviar a SHI, não sendo necessário a utilização de agentes parasiticidas nestes pacientes.

Na fase ativa, parenquimatosa, da NCC alguns pacientes podem apresentar episódios convulsivos que respondem bem, sem recorrências, ao tratamento com FAE mantidos em doses adequadas. Parasiticidas são usados, nas dosagens descritas, associados à drogas corticosteróides e/ou imunossupressores para aliviar a reação inflamatória decorrentes da degeneração e morte dos cisticercos, frente à ação dos agentes dos parasiticidas. Sem o uso dos agentes parasiticidas o cisticerco, usualmente, inicia o processo de degeneração num período de 1 à 2 anos (**Kramer, L.D., *et al.***, 1989) culminando, com sua morte e calcificação, na fase inativa da NCC que vai levar ao uso continuado de anticonvulsivantes. Em alguns casos, quando o paciente não apresenta mais episódios convulsivos e os exames de imagem estão normais, os anticonvulsivantes podem ser retirados.

Na fase ativa extraparenquimatosa da NCC (subaracnoide, cisternal e ventricular) pode não haver resposta adequada à drogas parasiticidas. Quando existe hidrocefalia, com SHI, o tratamento deve ser cirúrgico. Os cisticercos ventriculares podem ser removidos por neuroendoscopia quando forem pequenos. Quando são de grandes tamanhos nos espaços ventriculares, cisternais ou subaracnoides tem de ser removidos através de craniotomia ampla o que sempre implica o risco de seqüelas e o perigo de infecções secundárias. Atualmente, em alguns casos de NCC ventricular, a derivação ventrículo-peritoneal tem sido associada às drogas parasiticidas e corticosteróides (**Shandera, W. X., White, A. C. Jr., Chen, J., *et al.***,

1994). Na NCC subaracnoide, as manifestações clinicas e a evolução natural do cisticerco ou cisticercos são variáveis. Quando estes são poucos e estão dispostos nos giros e sulcos corticais da convexidade a patogenia é muito semelhante à NCC parenquimatosa. Ocasionalmente um cisto único gigante alojado numa fissura, como a de Sylvius, e que provoque efeito de massa sobre as estruturas circunvizinhas deve ter tratamento cirúrgico. Cisticercose envolvendo as cisternas basais do encéfalo geralmente é associada com resposta inflamatória acentuada e aracnoidite (**Salgado, P., *et al.***, 1997). A aracnoidite basilar pode provocar vasculite levando à infartos lacunares do parênquima cerebral. Na fase resolutiva, a aracnoidite pode resultar em fibrose e hidrocefalia comunicante. O tratamento é feito com drogas antinflamatórias, especialmente os corticosteróides. Se houver hidrocefalia o tratamento, além dos antinflamatórios, é cirúrgico. Drogas parasiticidas podem ser usadas, contudo, a resposta terapêutica é menos pronunciada que na NCC parenquimatosa.

Na cisticercose raquidiana, o tratamento com fármacos como o praziquantel e o albendazol não está com a eficácia estabelecida pois devido a baixa freqüência relativa da agressão raquidiana, a experiência com este tipo de tratamento é pequena. Assim, o tratamento de compressão medular ou radicular por cistos livres no espaço subaracnóideo raquidiano é cirúrgico com exérese dos cistos livres por meio de laminectomia. A curto prazo, evolução pós-cirurgica é boa. A longo prazo, certos pacientes costumam desenvolver aracnoidite com recidiva das manifestações clínicas. Os cistos intramedulares, parenquimatosos, também são tratados cirurgicamente pois geralmente estão pouco aderidos ao parênquima o que facilita a sua remoção (**Akiguchi, I., *et al.***, 1979). Por outro lado, cistos intramedulares em degeneração podem apresentar aderências ao parênquima medular o que dificulta sobremaneira a sua ressecção. O tratamento da aracnoidite raquidiana com corticosteróides bem como a lise microcirurgica da reação inflamatória não são efetivos.

Na cisticercose ocular a terapia é cirúrgica com remoção do cisto, ou cistos, intraocular, não sendo efetivas as drogas parasiticidas. Antinflamatorios e corticosteróides são usados para o tratamento das reações inflamatórias.

A análise das principais publicações, em outubro de 2002, formulou as proposições do "*Current Consensus Guidelines for Treatment of Neurocysticercosis*" (**Garcia, H.H., *et al.***, 2002), que apresenta o que tem sido feito no tratamento da doença de acordo com os seguintes níveis de evidência: I – evidencia obtida por pelo menos um ensaio clinico controlado e randomizado; II-1 – evidencia obtida por ensaios planejados e bem controlados; II-2 – evidencia obtida por estudos cooperativos ou por estudos analíticos de casos-controle bem planejados, preferencialmente de mais de um centro ou grupo de pesquisa; II-3 – evidencia obtida por múltiplas séries temporais com ou sem intervenção, incluindo resultados drásticos de experimentos não-controlados; e III – evidencia obtida por opiniões de autoridades reconhecidas com base na experiência clínica, em estudos descritivos e em relatos de casos ou em relatos de comitês de expertos. As proposições estão resumidas na tabela 1.7.

1.2.4.9. Profilaxia

A NCC é importante causa de morbidade e mortalidade. Apesar do tratamento feito com antihelminticos ser eficaz a doença ainda é prevalente em muitas partes do mundo tornando-se necessário, pois, novas e melhores medidas de controle da infecção. Em 1993, o *Centers for Disease Control and Prevention* através da sua Força-Tarefa Internacional considerou a NCC como doença erradicável. A Academia Brasileira de Neurologia, através do comitê de prevenção da NCC, desde 1988, vem desenvolvendo atividades no sentido de erradicação da doença (**Centers for Disease Control and Prevention.** (1993). Recomendations of the International Task Force for Disease Eradication IITFDE); **Takayanagui, O.M.**, 1996). A Federação Mundial de Neurologia denunciou o descaso dos

Tabela 1.7. – Proposições para o tratamento da NCC baseados na literatura e no nível de qualidade de evidência (**Garcia, H.H., et al.**, 2002).

Doença	Infecção	Tratamento	Evidencia
Cistos Parenquimatosos			
- Cistos viáveis	Leve (1 à 5 cistos)	Parasiticida com corticosteróides	II-3
		Parasiticida; corticosteróides apenas se ocorrerem efeitos colaterais	
		Sem parasiticida; seguimento com Imagem	
	Moderada (+ de 5 cistos)	**Consenso: parasiticida com corticosteróides**	II-3
	Intensa (+ de 100 cistos)	Parasiticida com altas doses de corticosteróides	III
		Corticoterapia continuada; seguimento com imagem	
- Lesões hipercaptantes (cistos em degeneração)	Leve/Moderada	Sem parasiticida; seguimento com imagem	I
		Parasiticida com corticosteróides	II-3
		Parasiticida; corticosteróides apenas se ocorrerem efeitos colaterais	
	Intensa (Encefalite cisticercótica)	**Consenso: sem parasiticida; corticosteróides em altas doses e diuréticos osmóticos**	III
- Cisticercos calcificados	qualquer número	**Consenso: sem parasiticida**	III
Cistos Extraparenquimatosos			
- Cistos ventriculares		**Consenso: remoção endoscópica**	III
		Se não há endoscópio:	
		DVP e tratamento parasiticida	
		Craniotomia ampla	
- Cistos subaracnóideos		**Consenso: parasiticida com corticosteróides; DVP se houver hidrocefalia**	II-3
- Hidrocefalia sem cisto		**Consenso DVP; sem parasiticida**	
Cistos Raquidianos (intra ou extramedulares)		**Consenso: cirúrgico; casos isolados de sucesso com albendazol e corticosteróides**	III
Cisticercose ocular		**Consenso: ressecção cirúrgica dos cistos**	II-3

governos nas medidas de erradicação da NCC e, em outubro de 1991, no VIII Congresso Pan-Americano de Neurologia propôs e encaminhou à Organização Pan-Americana de Saúde (Opas/OMS) as medidas e estratégias à seguir, que ficaram conhecidas como a Declaração de Montevidéu, para o controle do complexo teníase-cisticercose:

Programas de Intervenção à Longo Prazo

- Legislação adequada para implantar a notificação compulsória do complexo teníase-cisticercose;
- Aprimoramento das condições de saneamento ambiental;
- Educação sanitária da população;
- Modernização da suinocultura;
- Eficácia na inspeção dos produtos cárneos

Programas de Intervenção à Curto Prazo

- Tratamento em massa da Teníase da população (**Román, G. *et al.***, 2000);
- Busca, tratamento e notificação de portadores de teníase em torno do paciente;
- Educação da população sobre os mecanismos de transmissão e como melhorar as condições de higiene e saneamento;
- Aplicação da inspeção das carnes e limitação do reservatório animal por meio de tratamento e vacinação dos suínos.

Com base nas medidas de controle indicadas sugerem-se programas de educação em saúde que esclareçam a população a necessidade de congelar a carne à temperaturas inferiores à -15°C pelo menos durante 6 dias. Ainda, para diminuir a transmissibilidade da doença, este congelamento poderia ser feito no próprio frigorífico, antes da distribuição da carne para o mercado consumidor (**Pfuetzenreiter, M.R.**, 1997).

Apesar das medidas, estratégias e programas propostos pela Organização Pan-Americana de Saúde, Organização Mundial de Saúde, Federação Mundial de Neurologia e Academia Brasileira de Neurologia os sistemas de saúde pública não tem conseguido o

controle adequado do complexo teníase-cisticercose, pois os programas não tem sido aplicados, inviabilizando, assim, a informação, o controle e a erradicação da doença.

1.3. Ensaio tipo ELISA como Ferramenta Diagnóstica

Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, imunodetecção, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para a pesquisa e aplicações clínicas. Dentre esses métodos, um dos mais usados é o ELISA que possui alta eficiência podendo detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas (10^{-9}g). ELISA é abreviatura para "*enzyme-linked immunosorbent assay*" significando: ensaio de imunoadsorção ligado à enzima. Consiste em teste de alta sensibilidade para detectar e medir interações entre antígenos e seus específicos anticorpos. Tanto antígenos quanto anticorpos, podem ser imobilizados numa superfície sólida, usualmente, dentro dos 96 poços ou cavidades (w*ells*) de uma placa de microtitulação, para a captura dos seus ligantes específicos presentes numa solução. Posteriormente, como o substrato forma um produto colorimétrico, tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser verificados, visualizados ou terem seus índices de absorbância gerados através de um espectrofotômetro que irá determinar a relação entre a intensidade da cor e e a quantidade do que está sendo analisado na amostra (**Fig. 1.14**). Tem elevada sensibilidade e especificidade, rapidez, custo baixo, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação à difefrentes graus de automação. No teste de ELISA deve-se selecionar um par de anticorpos, que podem ser monoclonais ou policlonais. O uso de anticorpos monoclonais resulta em maior especificidade. O conhecimento básico das estrutura e funcionamento de um anticorpo e um antígeno é condição necessária para o entendimento dos ensaios imunoenzimáticos tipo ELISA (**Nascimento, E., *et al.***, 1987).

1.3.1. Marcadores Moleculares e Genômica

O desenvolvimento de novas técnicas de pesquisas, utilizando características do ácido desoxirribonucléico (DNA) que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente, iniciou a era dos marcadores moleculares antigênicos, que quanto mais

sensíveis e específicos, são de fundamental importância no imunodiagnóstico sorológico de várias patologias, dentre elas, a NCC (**Cohen, S.N.** , 1975).

A demonstração de que a informação genética poderia passar de uma bactéria para outra, por meio do processo de conjugação, e que vírus bacteriófagos também eram capazes de levar informação (DNA) de um hospedeiro para o outro, aliada à descoberta das enzimas de restrição (capazes de reconhecer e clivar sequências especificas de DNA), permitiram o desenvolvimento da técnica denominada de clonagem. Experiências subseqüentes como a de inserir um gene de uma espécie no DNA de uma bactéria marcaram o inicio da Engenharia Genética ou Tecnologia do DNA Recombinante (**Alberts, B., *et al.***, 1997).

Milhares de trabalhos conduzidos por cientistas no mundo todo visam a obtenção de organismos geneticamente modificados (OGM) para diferentes fins. Esta possibilidade de transferência de DNA de uma espécie para outra é possível devido à molécula de DNA apresentar características similares entre os diferentes organismos que são diferenciados entre si, apenas pela sequência das subnidades (bases) que compõem a molécula e o seu tamanho (**Watson, J.D., *et al.***, 1992). A sequência de bases do DNA foi decifrada, no final da década de 1970, por dois grupos de pesquisadores que desenvolveram diferentes estratégias de seqüenciamento (**Sanger, F., *et al.***, 1977); (**Maxam, A.M. & Gilbert, W.** , 1977). Na década de 1990, a técnica de seqüenciamento foi automatizada permitindo a leitura de milhares de bases por dia, e com isso o seqüenciamento completo do DNA de diversos organismos, dando origem à uma nova ciência denominada Genômica e junto com ela a Bioinformática, com variados programas para análise de sequências e bancos de dados de genes, em que sequências de DNA são depositadas e disponibilizadas através de rede de alcance mundial, a Internet (*world wide web*) (**Altschul, S.F., *et al.*** , 1990). Os sequenciamentos dos DNA dos humanos e de algumas espécies demonstraram que existem semelhanças entre processos metabólicos de organismos distantes evolutivamente, classificando-os não apenas quanto às

características fenotípicas mas também com base nas sequências de DNA e proteínas originando, portanto, mais um novo ramo na biologia denominado de Genômica Evolucionária (**Rubin, G.M.**, 2001).

A introdução, em 1970, de um conjunto de técnicas denominadas de "Tecnologia do DNA Recombinante" (TDR) deu um grande impulso à Biologia, com o desenvolvimento das mais diversas linhas de pesquisa em todo mundo. Outras técnicas envolvendo a expressão de peptídeos e proteínas *in vitro*, além dos estudos de interações entre ácidos nucléicos e destes com proteínas, tem possibilitado o entendimento do funcionamento dos processos bioquímicos ciclo celular, mecanismos de infecção e os aspectos moleculares de interação de patógenos com o hospedeiro (**Kaff, N.S., *et al.***, 1998).

1.3.2. A Expressão Fenotipica em Bacteríofagos (*Phage Display*)

Um grande número de diferentes moléculas, tais como pequenos peptídeos, proteínas e anticorpos, podem não somente serem visualizados ou expressos na superfície de bacteriófagos (fagos) filamentosos (*Phage display*) como também replicados, permitindo a construção de variadas bibliotecas moleculares conformacionais (**Smith, G.P.**, 1985) e consiste de seleção, *in vitro*, na qual uma proteína ou peptideo heterologo é fusionado e expresso genéticamente às proteínas superficiais do capsideo viral de um bacteriófago filamentoso da classe M13 (**Fig. 1.15**).

Desde então houve considerável desenvolvimento de novas biomoléculas com o objetivo de se obter fármacos, vacinas e outras drogas de interesse biotecnológico e progressos foram feitos nas técnicas e aplicações das bibliotecas incluindo seu uso no estudo das interações protéicas, evolução molecular e para a produção de anticorpos recombinantes (**Willats, W.G.T.**, 2002).

A seleção de mimotopos possibilitando mimetizar um epitopo descontinuo, utilização de imunógenos, com sequências previamente selecionadas, identificação de epitopos reconhecidos por anticorpos mono ou policlonais e seleção de anticorpos associados à doenças para serem usados no diagnóstico e vacinação são algumas das aplicações desta metodologia.

Finalizando, a neurocisticercose constitui-se sempre em grave comprometimento do sistema nervoso central. Possuiu elevada prevalência no território brasileiro e variadas manifestações clínicas, sendo o diagnóstico feito, na maioria das vezes, de forma errônea. O padrão-ouro para o diagnóstico continua sendo os exames de neuroimagens que não são acessíveis para uma grande parcela da população, principalmente a mais carente. Apesar de ser considerada, por alguns autores, uma doença benigna, a morbidade e mortalidade persiste elevada. Tornam-se, pois, necessários métodos de análise crítica, desenvolvimentos de conhecimentos, de estratégias de pesquisa na área das neuroparasitoses que permitam não só estabelecer o diagnóstico mas também discriminar o mais precocemente possível as formas de evolução mais grave e estabelecer terapêuticas adequadas. O presente trabalho tem como escopo o estudo das características clínicas e possível padronização de um método imunodiagnóstico para a NCC que seja de fácil realização, pequeno custo e que possa ser introduzido na rotina laboratorial para a pesquisa e levantamento epidemiológico em áreas endêmicas, obtendo, dessa forma, estratégias controle, terapêutica e prevenção mais adequados da NCC humana.

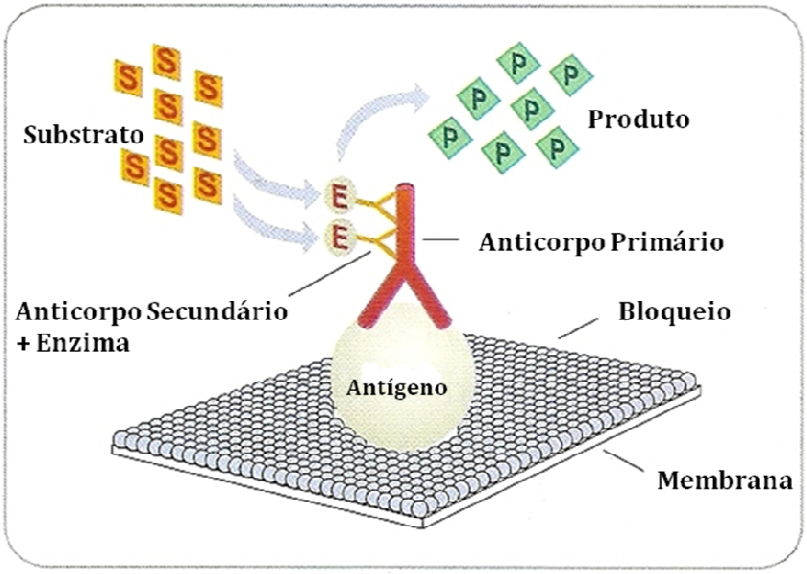


Fig. 1.14 – Diagrama mostrando os diversos estágios do teste de ELISA (**Immunodetection-Application and Product Guide**, 2008)

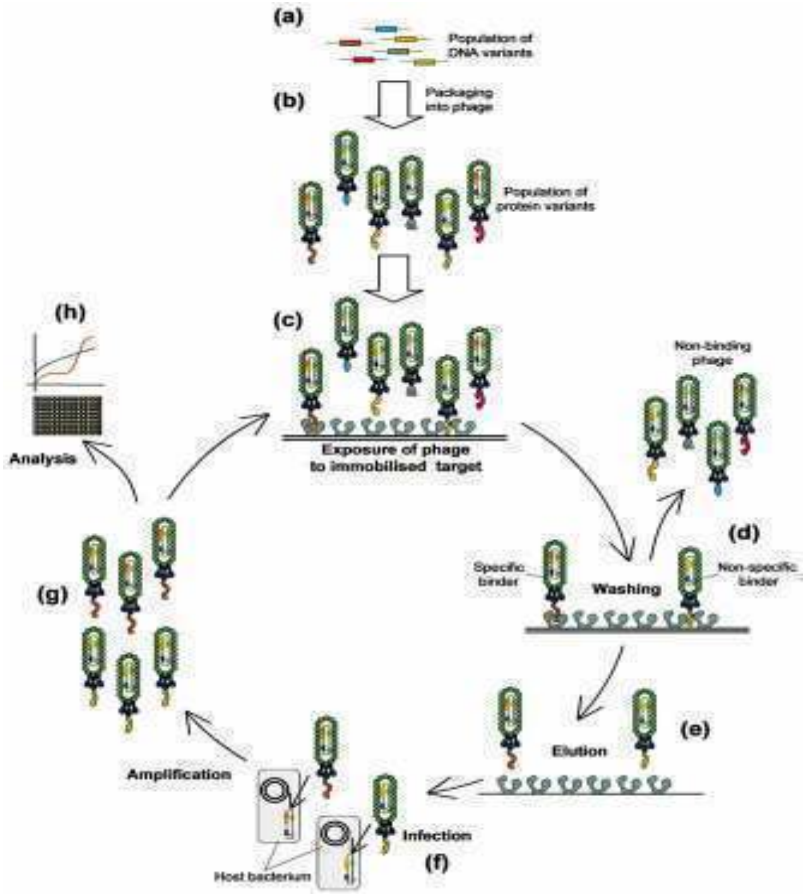


Fig. 1.15 – A expressão fenotípica em bacteriófagos (*Phage display*) (**Willats, W.G.T.**, 2002)

Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1. Gerais:

Demonstrar os aspectos clínicos do complexo teníase-cisticercose e da NCC humana, a viabilidade de ensaio imunoenzimático, pelo método de ELISA, utilizando peptídeos sintéticos previamente selecionados pela técnica de expressão em superfície de fagos filamentosos (*Phage display*), que possa ser padronizado em teste imunodiagnóstico para a detecção da NCC humana.

2.2. Específicos:

- Demonstrar a especificidade de peptídeos sintéticos, previamente selecionados pela técnica de *Phage display*, para a NCC humana;
- Determinar em soros de pacientes afetados pela NCC a sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Determinar a viabilidade de padronização de teste imunodiagnóstico, tipo ELISA, para a NCC humana.

Metodologia

3 – METODOLOGIA

3.1. Desenho de Estudo

Estudo de teste de diagnóstico, transversal, de acurácia, com comparação independente e randomizada de pacientes consecutivos e representativos, todos submetidos ao teste diagnóstico e ao padrão de referência (padrão ouro).

3.2. Pacientes e Grupos de Estudo

Foram incluídos no estudo amostra (n) constituída de soros sanguíneos de um total de 80 indivíduos de ambos os sexos, faixa etária entre 4 e 86 anos, distribuídos nos seguintes grupos:

GRUPO I – 23 soros de crianças, faixa etária entre 4 e 13 anos, coletados pelo Projeto Morro Alto/2008 – Coltec/UFMG. O grupo em análise foi submetido ao exame coprológico de sedimentação espontânea, ou HPJ (*Método de Hoffman, Pons e Janer*), com a finalidade de identificação de diversas infestações parasitárias. A utilização de tais soros no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG. Dentre as crianças que apresentaram ausência de parasitas no exame HPJ, 4 foram utilizadas como controle negativo para NCC e para elaboração do ponto de corte ("cut off") do experimento.

GRUPO II – Soros sanguíneos de 57 indivíduos, faixa etária entre 9 e 86 anos, incluídos através de consentimento informado, encaminhamento de protocolo à Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG, exames de neuroimagem e ficha individual de dados clínicos, neurológicos e de exames complementares, todos residentes na cidade de Barbacena/MG, divididos em dois subgrupos: pacientes sem Neurocisticercose, NSS (n=34), e pacientes com Neurocisticercose, NCC (n=23), confirmada através de exames de imagem (Tomografia Computadorizada cerebral e Ressonância Nuclear Magnética do encéfalo) considerados como Padrão Ouro no diagnóstico da NCC.

Para o estudo da reatividade dos soros dos grupos I e II foram utilizados como antígenos o Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* (SPACc – *Scolex Protein Antigen from Cysticercus cellulosae*) e o peptídeo sintético (pepNCC) selecionado através da técnica de expressão de peptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos (*Phage Display*).

3.3. Síntese Química do Peptídeo selecionado por *Phage Display*

O peptídeo selecionado por *Phage Display* (pepNCC) possui a sequência de aminoácidos SKSSITITNKRLTRKC e foi sintetizado quimicamente pela estratégia *F-moc* (**Chávez-Olórtegui, C. *et al.***, 2009), liofilizado, purificado em HPLC de fase reversa e analisado em espectrômetro de massa para confirmação de sua massa molecular.

O pepNCC encontra-se liofilizado e armazenado a -20ºC sob os cuidados do Prof. Carlos Chávez Olórtegui, orientador deste trabalho. Para uso, o peptídeo foi dissolvido em água *milli-Q* e sua concentração ajustada para 1mg/mL.

3.4. Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* (SPACc)

O Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* foi utilizado como antígeno sensibilizador nos ensaios tipo ELISA frente aos soros de pacientes portadores ou não-portadores de NCC e frente aos soros de indivíduos do grupo controle.

Os escólex dos *Cysticercus cellulosae* foram extraídos e congelados em nitrogênio líquido para a inibição de proteases e, a seguir, triturados rapidamente em gral de porcelana até se transformarem em pó. O pó de escólex compõe-se de material bruto contendo todas as estruturas celulares e foi gentilmente cedido pelo Prof. Evaldo Nascimento, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Ao pó de escólex, adicionou-se solução tampão de extração 10% (Tris Base 10 mM, CHAPS 1 mM, EDTA 5 mM, PMSF 100mM, TPCK 100 mM, Mertiolate 1:100) e, em

seguida, agitou-se em vórtex por 10min. O homogenato foi, então, centrifugado a 14000 rpm, a 4ºC, durante 30min. O sobrenadante (SPACc) foi, por fim, coletado, dosado pelo método de Bradford **(Bradford, 1976)** e armazenado a -20ºC até o momento de uso.

3.5. Reatividade de Soros Humanos frente ao Extrato Solúvel de Escólex de *Cysticercus cellulosae* (ELISA-SPACc)

A validação da reatividade e titulação do SPACc, para o preparo e padronização de teste imunodiagnóstico, utilizou ensaios de ELISA de acordo com o protocolo descrito por **Chavéz-Olórtegui, C., 1991**, com algumas modificações.

Placas de microtitulação em PVC (BD-Falcon) de 96 cavidades (poços) foram sensibilizadas com diferentes concentrações do SPACc e incubadas a 4ºC durante 16h (overnight). O antígeno sensibilizador foi diluído em *Coating Buffer* pH 9,6 (Bicarbonato de sódio 0,02M) e adicionado á placa no volume de 100 µL/poço. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 160 µL/poço da solução de caseína 2% em PBS 1x, a 37ºC, durante 1h. Em seguida, lavou-se três vezes as placas com solução de lavagem (0,05% Tween-salina-SL) e adicionou-se os soros humanos diluídos em tampão de incubação (caseína 0,25%, 0,05% Tween 20) no volume final de 100 µL/poço. Como controle negativo do experimento, utilizou-se quatro soros de crianças, coletados pelo Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG, que apresentaram ausência de parasitas no exame HPJ. As placas foram incubadas durante 1h, a 37ºC. Após, as cavidades foram lavadas três vezes com solução de lavagem e incubadas a 37^{o}C, durante 1h, com o anticorpo anti IgG humana conjugado à peroxidase (Sigma), diluído 1:4000. As cavidades foram lavadas novamente por três vezes e reveladas com 100 µL/poço de solução reveladora (2mg OPD, 10ml Tampão Citrato, 2µL H_20_2).

As leituras das densidades ópticas (absorbâncias) de cada cavidade foram determinadas em leitor de ELISA utilizando filtro de 492nm. Amostras de soro evidenciando índices de absorbâncias maiores que a média dos controles negativos mais duas vezes o desvio-padrão foram consideradas positivas.

3.6. Reatividade de Soros Humanos frente ao pepNCC (ELISA-peptídeo)

A validação da reatividade e titulação do pepNCC, para o preparo e padronização de teste imunodiagnóstico, utilizou ensaios de ELISA de acordo com o protocolo descrito por **Boarino *et al.*, (2005)**, com algumas modificações.

Placas de microtitulação em PVC (BD-Falcon) de 96 cavidades (poços) foram sensibilizadas com diferentes concentrações do pepNCC e incubadas a 37ºC durante 16h (overnight). O antígeno sensibilizador foi diluído em água *milli-Q* e adicionado à placa no volume de 50 µL/poço. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 60 µL/poço da solução de caseína 2,5% em PBS 1x, a 37ºC, durante 1h. Em seguida, lavou-se três vezes as placas com solução de lavagem (0,05% Tween-salina-SL) e adicionou-se os soros humanos diluídos em tampão de incubação (caseína 1,25% em PBS 1x) no volume final de 50 µL/poço. Como controle negativo do experimento, utilizou-se quatro soros de crianças, coletados pelo Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG, que apresentaram ausência de parasitas no exame HPJ. As placas foram incubadas durante 1h, a 37ºC. Após, as cavidades foram lavadas três vezes com solução de lavagem e incubadas a 37^{o}C, durante 1h, com o anticorpo anti IgG humana conjugado à peroxidase (Sigma), diluído 1:4000. As cavidades foram lavadas novamente por três vezes e reveladas com 100 µL/poço de solução reveladora (2mg OPD, 10ml tampão citrato, 2µL H_20_2).

As leituras das densidades ópticas (absorbâncias) de cada cavidade foram determinadas em leitor de ELISA utilizando filtro de 492nm. Amostras de soro evidenciando

índices de absorbâncias maiores que a média dos controles negativos mais duas vezes o desvio-padrão foram consideradas positivas.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística do presente estudo foi feita com base no teste para diferença de proporções e na análise da Curva ROC.

O teste para diferença de proporções testa a hipótese nula de igualdade entre as proporções contra a hipótese alternativa de diferença entre as mesmas.

Para um nível de significância pré-estabelecido de 0,05, um resultado que rejeite a hipótese nula, afirma que os testes diagnósticos em estudo (ELISA-SPACc e ELISA-peptídeo) diferem na maneira de classificação. Já um resultado que aceite a hipótese nula, afirma que os testes são semelhantes na maneira de classificação.

As curvas ROC (Receiver Operator Characteristic) são uma forma de representar a relação, normalmente antagônica, entre a sensibilidade e a especificidade de um teste diagnóstico quantitativo, ao longo de um contínuo de valores de "cut off point". Elas descrevem a capacidade discriminativa de um teste diagnóstico para um determinado número de valores "cut off point". Isso permite pôr em evidência os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade.

As curvas ROC ainda permitem quantificar a exatidão de um teste diagnóstico, já que, essa é proporcional à área sob a curva ROC, isto é, tanto maior quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama. Sabendo isto, a curva será útil, também, na comparação de testes diagnósticos, tendo um teste uma exatidão tanto maior, quanto maior for a área sob a curva ROC.

Resultados

4 – RESULTADOS

A habilidade de detectar anticorpos especificos anti – *C. cellulosae* no soro de pacientes foi testada, utilizando-se o peptídeo sintético (pepNCC) e o extrato solúvel de escólex de *C. cellulosae* (SPACc), através de ensaios tipo ELISA indireto.

4.1. Análise Descritiva dos Dados

4.1.1. Variável Sexo

Dos pacientes incluídos no estudo, cujos soros foram coletados em Barbacena/MG, observa-se que a maioria é do sexo feminino. Dos 57 indivíduos da amostra 35 são mulheres, ou seja, aproximadamente 60% das pessoas.

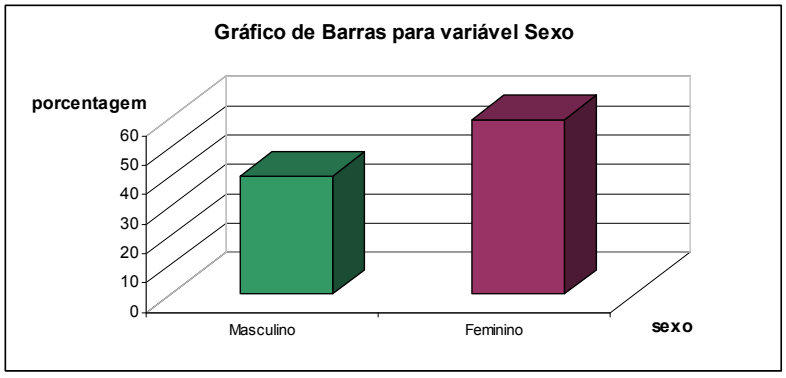


Fig.4.1. – Gráfico de Barras para a variável sexo

Tabela 4.1. – Tabela de freqüências para a variável sexo

	Freqüência	Porcentagem	Percentual Válido	Percentual Acumulado
Masculino	23	40,4	40,4	40,4
Feminino	34	59,6	59,6	100,0
Total	57	100,0	100,0	

4.1.2. Variáveis Idade e Nódulos

Pela Figura 4.2., nota-se que a distribuição das idades não é homogênea, ou seja, os pacientes que compõem a amostra em estudo distribuem-se entre as classes de idade de maneira distintas. Existe, por exemplo, mais indivíduos na classe seis (de 51 a 60 anos) e menos indivíduos nas classes um (de 0 a 10 anos), cinco (de 41 a 50 anos) e nove (de 81 a 90 anos).

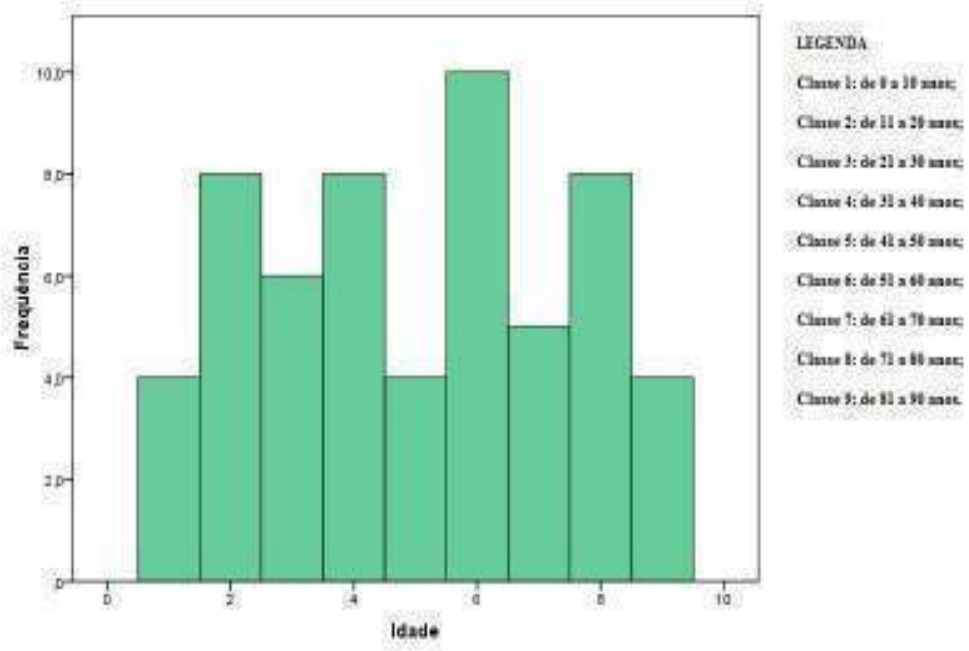
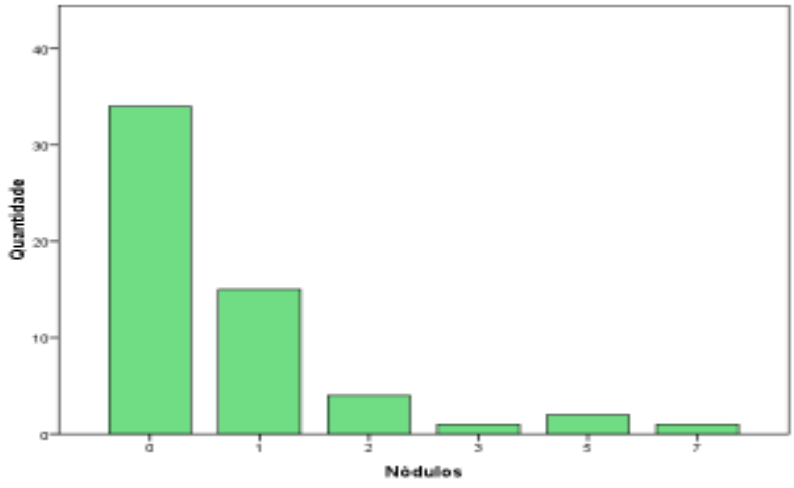


Figura 4.2. - Histograma para variável Idade



4.3. – Histograma para variável nódulo

Analisando-se a figura 4.3., observa-se que, à medida que o número de nódulos presentes aumenta, o número de pacientes da amostra decresce, logo, existem poucos indivíduos com um número elevado de nódulos e uma freqüência muito alta de pessoas com poucos nódulos.

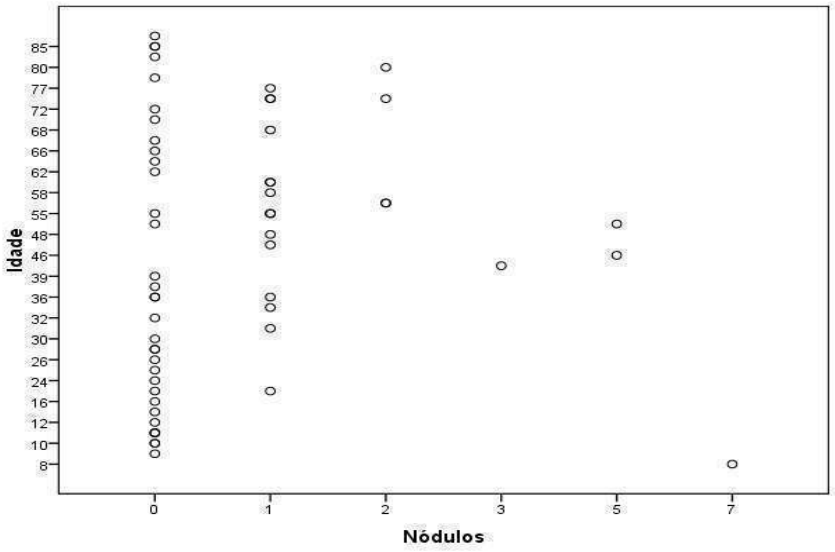


Figura 4.4. - Diagrama de dispersão das variáveis Idade versus Nódulos

Observando-se a dispersão do número de nódulos pela idade, Fig. 4.4., tem-se que o paciente que possui a maior quantidade de nódulos (7) é também o mais novo da amostra (com 8 anos). A maior freqüência é a de pessoas que não possuem nenhum nódulo e observa-se que a idade dessas pessoas distribui-se homogeneamente. À medida que o número de nódulos aumenta, a idade parece também aumentar, a não ser para o último caso, atípico.

Tabela 4.2. – Tabela de freqüências para as variáveis Idade e Nódulos

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	57	8	86	45,40	24,089
Nódulos	57	0	7	0,75	1,379
Válidos	57				

Observando-se a tabela 4.2., tem-se que o valor mínimo de idade foi 8 anos e máximo 86 anos, sendo a idade média de 45,4 anos. O desvio padrão da idade é 24,089 anos o que indica claramente que existe uma grande dispersão na idade.

O número mínimo de nódulos foi 0 e o máximo foi 7, sendo que a média do número de nódulos é 0,75 e o desvio de 1,379.

4.1.3. Variável Exame de Neuroimagem

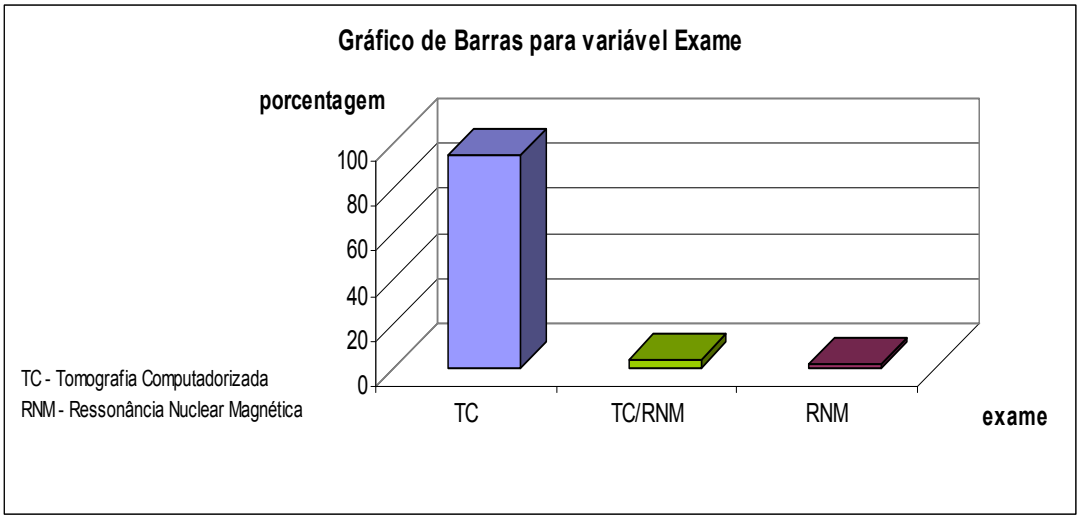


Figura 4.5. - Gráfico de Barras para variável Exame

Tabela 4.3. – Tabela de freqüências para a variável Exame

	Freqüência	Porcentagem	Percentual Válido	Percentual Acumulado
Tomografia Computadorizada	54	94,7	94,7	94,7
Ressonância Nuclear Magnética	1	1,8	1,8	96,5
TC/RNM	2	3,5	3,5	100,0
Total	57	100,0	100,0	

Das 57 pessoas presentes na amostra, a grande maioria (54 delas, ou 94,7% dos indivíduos) fez o exame de Tomografia Computadorizada, 1 pessoa fez apenas a Ressonância Nuclear Magnética, enquanto 2 pessoas fizeram ambos os exames (Fig.4.5. e Tabela 4.3.).

4.1.4. Diagnóstico clínico da NCC utilizando-se exames de neuroimagem

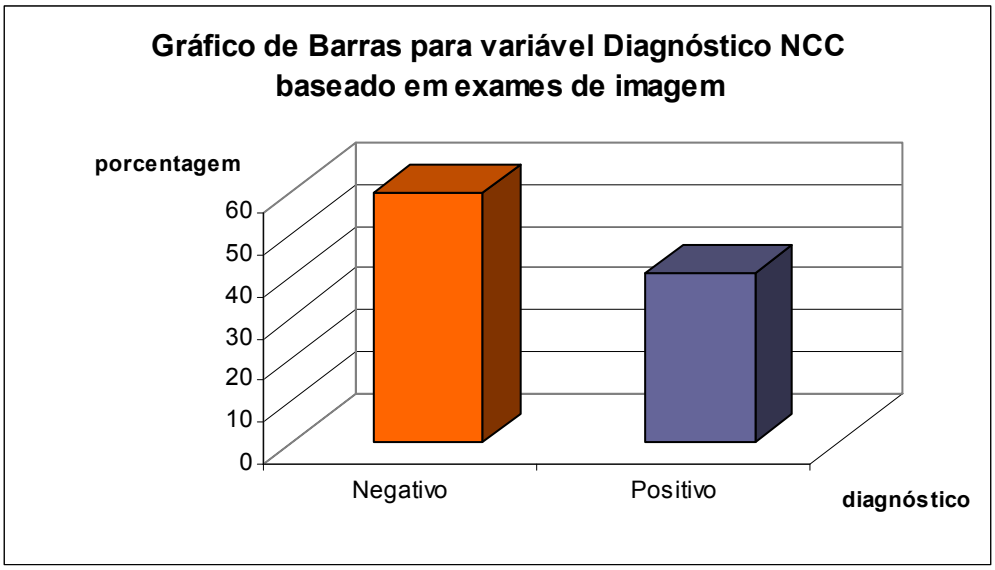


Figura 4.6. - Gráfico de Barras para a variável Diagnóstico NCC

Tabela 4.4. – Tabela de freqüências para variável Diagnóstico Clinico da NCC

	Freqüência	Porcentagem	Percentual Válido	Percentual Acumulado
Negativo	34	59,6	59,6	59,6
Positivo	23	40,4	40,4	100,0
Total	57	100,0	100,0	

Das 57 pessoas amostradas, 34 obtiveram um diagnóstico negativo para NCC, ou seja, aproximadamente 60% das pessoas; enquanto 23 pessoas obtiveram um diagnóstico positivo, ou seja, 40% delas (Fig. 4.6. e Tabela 4.4.).

Dentre as diversas manifestações clínicas encontradas (Tabela 4.5.), a mais freqüente é Cefaléia (28,1%), seguida por Epilepsia (13,3%). Os pacientes com ausência de comorbidades totalizaram 12,3% da amostra. As mais infreqüentes são AVC Isquêmico; Calcificação dos Núcleos Basais; IVCI; Labirintopatias; Demência, Parkinson; Redução Volumétrica do Encefálo, Oligofrenia, Malformação SNC (Chiari-II), Síncope, Bloqueio AV II Grau, Síndrome da Fadiga Crônica, Síndrome Neuromotora, Toxoplasmose e Tremor MSD.

4.2. Titulação do Extrato Solúvel do Escólex de *Cysticercus cellulosae* (SPACc)

Com um *pool* de soros de todos os pacientes positivos para Neurocisticercose, confirmados por exames de neuroimagem e um pool de soros de todas as crianças do Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG que apresentaram ausência de parasitas no exame coprológico HPJ, fez-se uma ELISA de acordo com o método descrito por **Chavéz-Olórtegui, C., 1991**, com a finalidade de definir uma concentração ótima de SPACc a ser utilizada no teste imunodiagnóstico da NCC Humana que utiliza o extrato como antígeno sensibilizador.

As concentrações de SPACc utilizadas na sensibilização da placa foram de 2µg/poço, 1µg/poço, 0,5µg/poço, 0,25µg/poço, 0,125µg/poço, 0,0625µg/poço e 0,0312µg/poço. Utilizou-se uma diluição dos pools de soros de 1:800.

Pode-se observar, pela análise da figura 4.7., que a concentração de SPACc que melhor diferenciou o pool de soros positivos do pool de soros negativos foi a de 0,5µg/poço.

Tabela 4.5. - Tabela de frequencias para a variável manifestações clínicas

	Freqüência	Porcentagem	Percentual Válido	Percentual Acumulado
ADNPM	6	10,5	10,5	10,5
AVC Isquêmico	1	1,8	1,8	12,3
Calcificação Núcleos Basais	1	1,8	1,8	14,0
Cefaléia	16	28,1	28,1	42,1
Cefaléia, IVCI	1	1,8	1,8	43,9
Cefaléia; Labirintopatia	1	1,8	1,8	45,6
Cefaléia; Tonturas	1	1,8	1,8	47,4
Demência; Parkinson	1	1,8	1,8	49,1
Demência; Redução Volumétrica Encefálico	1	1,8	1,8	50,9
Doença Encefalo-Vascular Isquêmica	2	3,5	3,5	54,4
Epilepsia	7	13	13	66,7
Epilepsia; Oligofrenia	1	1,8	1,8	68,4
IVCI	2	3,5	3,5	71,9
Malformação SNC (ChiariII); Epilepsia	1	1,8	1,8	73,7
Redução Volumétrica Encéfalo	1	1,8	1,8	75,4
Ausência de comorbidades	7	12,3	12,3	87,7
Síncope; Bloqueio AV II Grau	1	1,8	1,8	89,5
Síndrome da Fadiga Crônica	1	1,8	1,8	91,2
Síndrome Neuromotora	1	1,8	1,8	93,0
Tonturas	1	1,8	1,8	94,7
Transtorno Psiquiátrico	1	1,8	1,8	96,5
Transtorno Psiquiátrico; Toxoplasmose	1	1,8	1,8	98,2
Tremor MSD	1	1,8	1,8	100,0
Total	**57**	**100,0**	**100,0**	

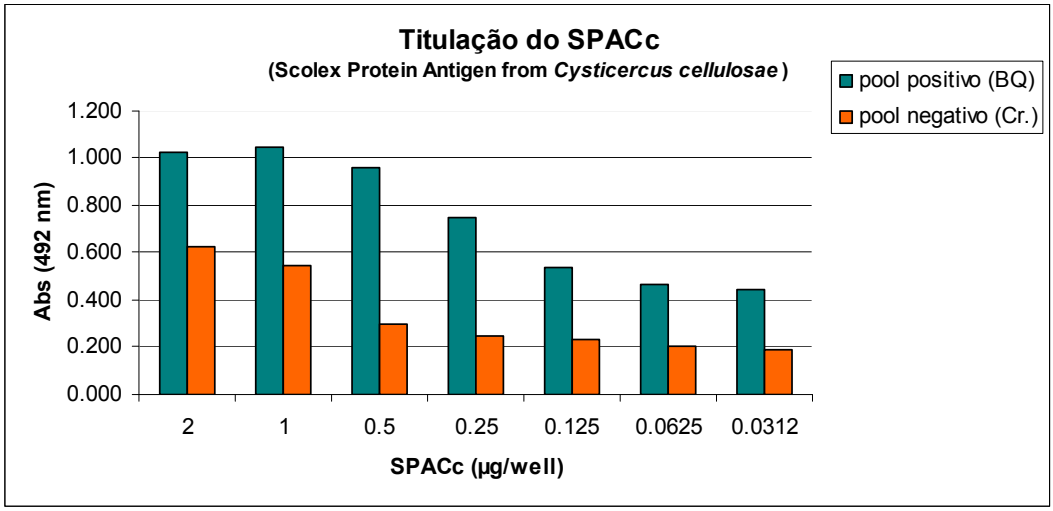


Figura 4.7. - Titulação do antígeno protéico de *Cysticercus cellulosae* frente a um pool de soros positivos para NCC e a um pool de soros negativos para NCC. BQ=Barbacena, Cr=Crianças do Projeto Morro Alto – Coltec/UFMG

4.3. ELISA-SPACc como Teste Imunodiagnóstico para Neurocisticercose Humana

Fez-se ELISA de acordo com o método descrito por **Chavéz-Olórtegui, C.,** (1991), utilizando-se uma amostra (n=57) de todos os soros coletados em Barbacena, incluídos através de exames de neuroimagem e ficha individual de dados clínicos, neurológicos e de exames complementares, juntamente com uma amostra de soros de quatro crianças com ausência de parasitas no HPJ, utilizadas como controle negativo para NCC e para elaboração do ponto de corte ("cut-off") do experimento (Fig. 4.8.).

A concentração de SPACc utilizada na sensibilização da placa foi de 0,5µg/poço e a diluição dos soros foi de 1:800. Como fonte de segundo anticorpo foi utilizado anti-IgG humana conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:4000. O ponto de corte ("cut off point") foi definido calculando-se as média dos controles negativos mais duas vezes o desvio-padrão dos mesmos.

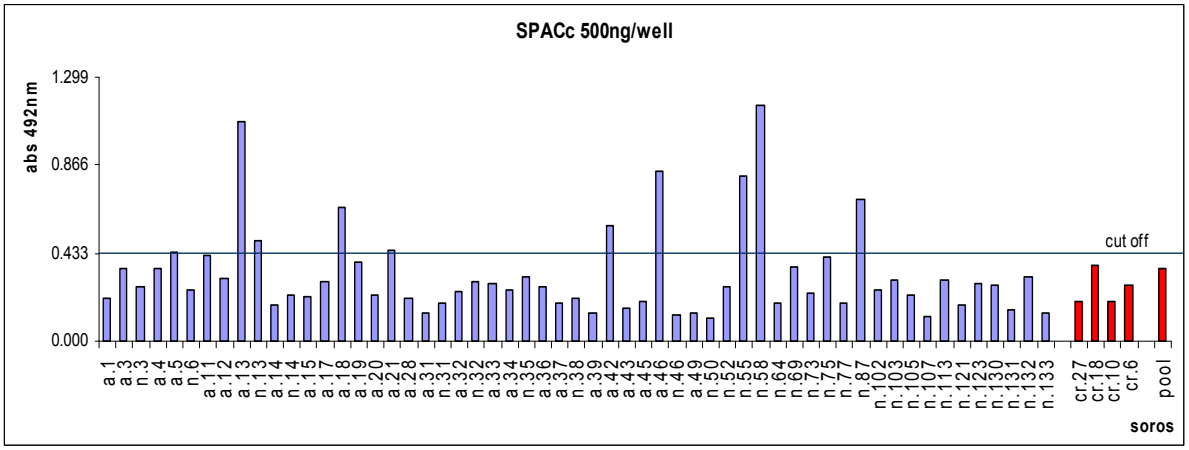


Figura 4.8. – ELISA-SPACc de soros humanos positivos e negativos para NCC, confirmados por neuroimagens, frente a 500ng/well de SPACc. Os soros foram diluídos a 1:800 e o conjugado, a 1:4000. (a=soros antigos; n=soros novos; cr=crianças do Projeto Morro Alto – Coltec/UFMG)

Observa-se pelo gráfico da Figura 4.8. que a maioria dos soros tendem a se associar com o diagnóstico negativo do teste ELISA-SPACc, observa-se que poucos soros apresentam um diagnóstico positivo e não existe uma associação clara nesse sentido.

4.4. Diagramas de Dispersão para ELISA-SPACc

4.4.1. Variáveis Manifestações Clínicas e Número de Nódulos relacionados ao Teste ELISA-SPACc para Neurocisticercose Humana

Como demonstrado no gráfico da Figura 4.9., no teste ELISA-SPACc, a maioria das manifestações clínicas parecem estar associadas a um diagnóstico negativo para NCC, sendo que a cefaléia é uma manifestação que parece estar muito associada ao diagnóstico negativo de doença.

Observando-se a Figura 4.10., percebe-se que maioria dos indivíduos não apresenta presença de nódulos e, dentre esses, sua maioria apresenta um diagnóstico negativo no teste ELISA-SPACc. Observa-se também que, para altos valores de número de nódulos o teste tende a diagnosticar o paciente como negativo.

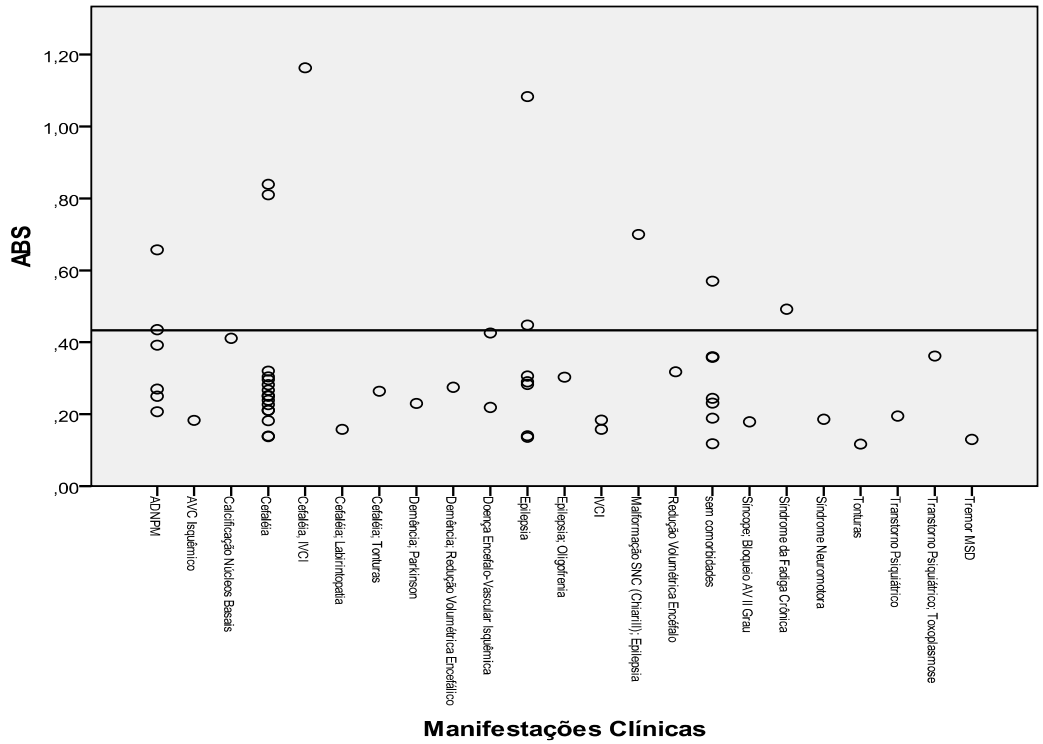


Figura 4.9. - Gráfico de dispersão para ELISA-SPACc relacionando as medidas de absorbâncias dos soros individuais com suas respectivas manifestações clínicas. O traço no gráfico representa o ponto de corte do experimento (cut-off = 0,433).

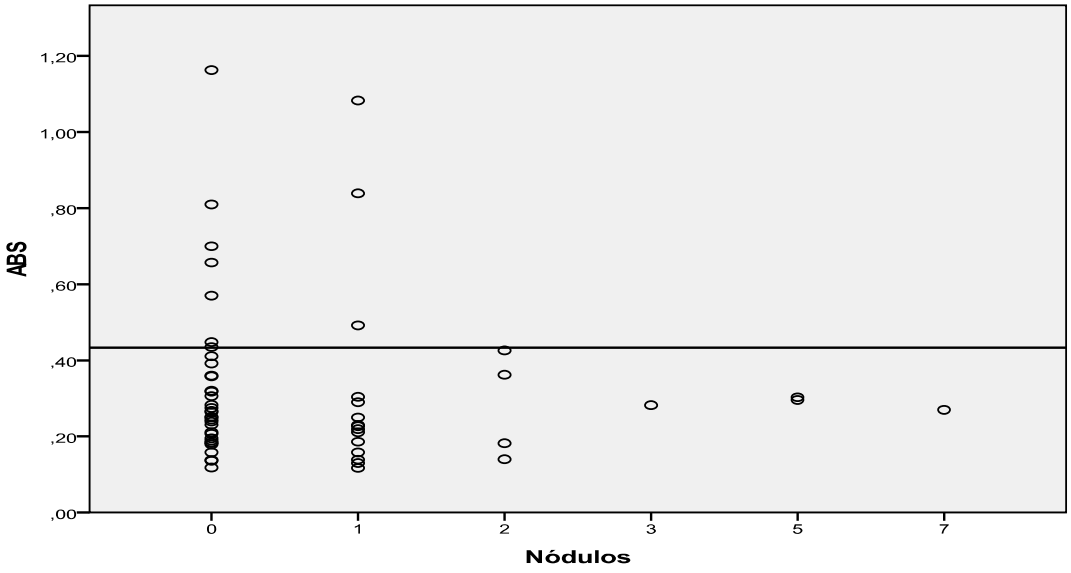


Figura 4.10. - Gráfico de dispersão para ELISA-SPACc relacionando as medidas de absorbâncias dos soros individuais com seus respectivos números de nódulos encontrados no exame de imagem. O traço no gráfico representa o ponto de corte do experimento (cut-off = 0,433).

4.5. Titulação do Peptídeo (pepNCC)

Com um *pool* de soros de todos os pacientes positivos para NCC e um *pool* de soros de pacientes negativos para NCC, confirmados por exames de neuroimagem, juntamente com *pool* de soros de todas as crianças do Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG que apresentaram ausência de parasitas no exame HPJ, fez-se uma ELISA de acordo com o método descrito por **Boarino *et al.*, 2005**, com a finalidade de definir uma concentração ótima de pepNCC a ser utilizada no teste imunodiagnóstico da NCC Humana que utiliza o peptídeo como antígeno sensibilizador.

As concentrações de pepNCC utilizadas na sensibilização da placa foram de 20ng/poço, 10ng/poço, 5ng/poço, 2,5ng/poço, 1,25ng/poço e 0,62ng/poço. Utilizou-se uma diluição dos pools de soros de 1:100.

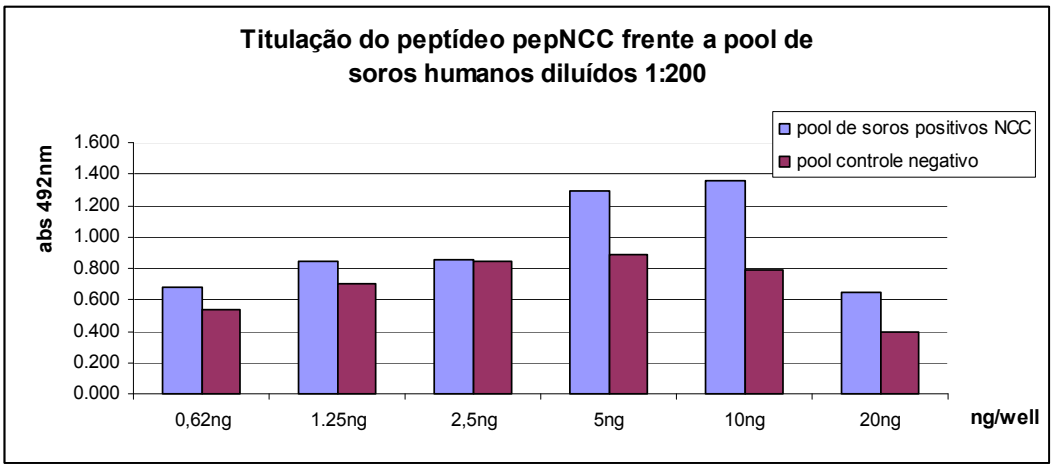


Figura 4.11. - Titulação do peptídeo sintético pepNCC frente a um *pool* de soros positivos para NCC, a um *pool* de soros negativos para NCC e a um *pool* de soros negativos de crianças. Os soros negativos de crianças foram coletados pelo Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG e utilizados como controle negativo do experimento.

Pode-se observar, pela análise da Figura 4.11., que a concentração de pepNCC que melhor diferenciou o *pool* de soros positivos do *pool* de soros do controle negativo foi a de 1,25ng/poço. A concentração de 5ng/poço, feita num estudo piloto, gerou inconsistências nos resultados.

4.6. ELISA-peptídeo como Teste Imunodiagnóstico para Neurocisticercose Humana

Fez-se uma ELISA de acordo com o método descrito por **Boarino *et al.*, 2005,** utilizando-se uma amostra (n=57) de todos os soros coletados em Barbacena, incluídos através de exames de neuroimagem e ficha individual de dados clínicos, neurológicos e de exames complementares, juntamente com uma amostra de soros de quatro crianças com ausência de parasitas no HPJ, utilizadas como controle negativo para NCC e para elaboração do ponto de corte ("cut-off") do experimento.

A concentração de pepNCC utilizada na sensibilização da placa foi de 1,25ng/poço e a diluição dos soros foi de 1:100. Como fonte de segundo anticorpo foi utilizado anti-IgG humana conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:4000. O ponto de corte ("cut-off point") foi definido calculando-se as média dos controles negativos mais duas vezes o desvio-padrão dos mesmos.

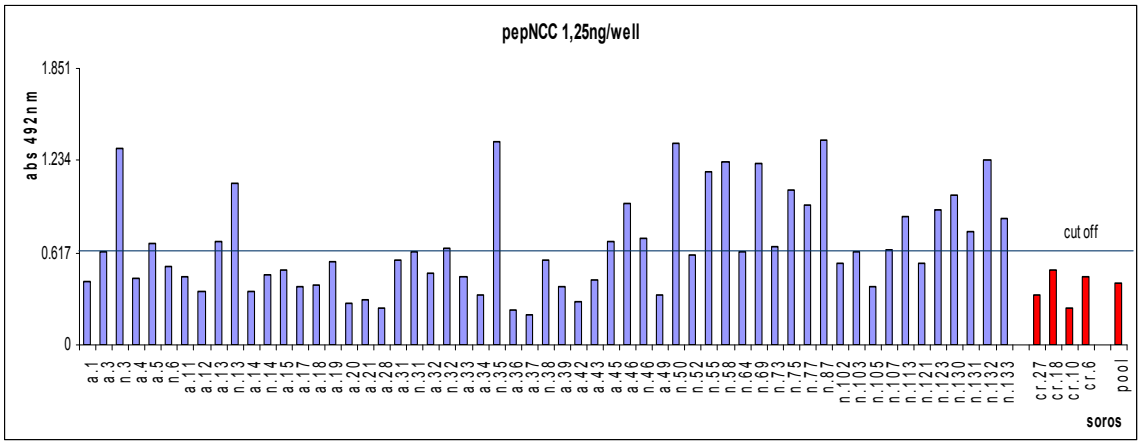


Figura 4.12. - ELISA-peptídeo de soros humanos positivos e negativos para NCC, confirmados por exames de imagem, frente a 1,25ng/well de pepNCC. Os soros foram diluídos a 1:100 e o conjugado, a 1:4000 (a=soros antigos; n=soros novos; cr=crianças do Projeto Morro Alto – Coltec/UFMG)

Observa-se, pelo gráfico da Figura 4.12., que 45,6% dos soros tende a se associar com o diagnóstico positivo do teste ELISA-peptídeo, enquanto que 54,4% apresentam um diagnóstico negativo e não existe uma associação clara nesse sentido.

4.7. Diagramas de Dispersão para ELISA-peptídeo

4.7.1. Variáveis Manifestações Clínicas e Número de Nódulos relacionados ao Teste ELISA-peptídeo para Neurocisticercose Humana

Observa-se na Figura 4.13. que, dentre as manifestações clínicas, ADNPM, Epilepsia e ausência de comorbidades são as variáveis mais associadas com o diagnóstico negativo no teste ELISA-peptídeo. Cefaléia é a manifestação mais freqüente, sendo que gera diagnósticos positivos e negativos de uma maneira homogênea.

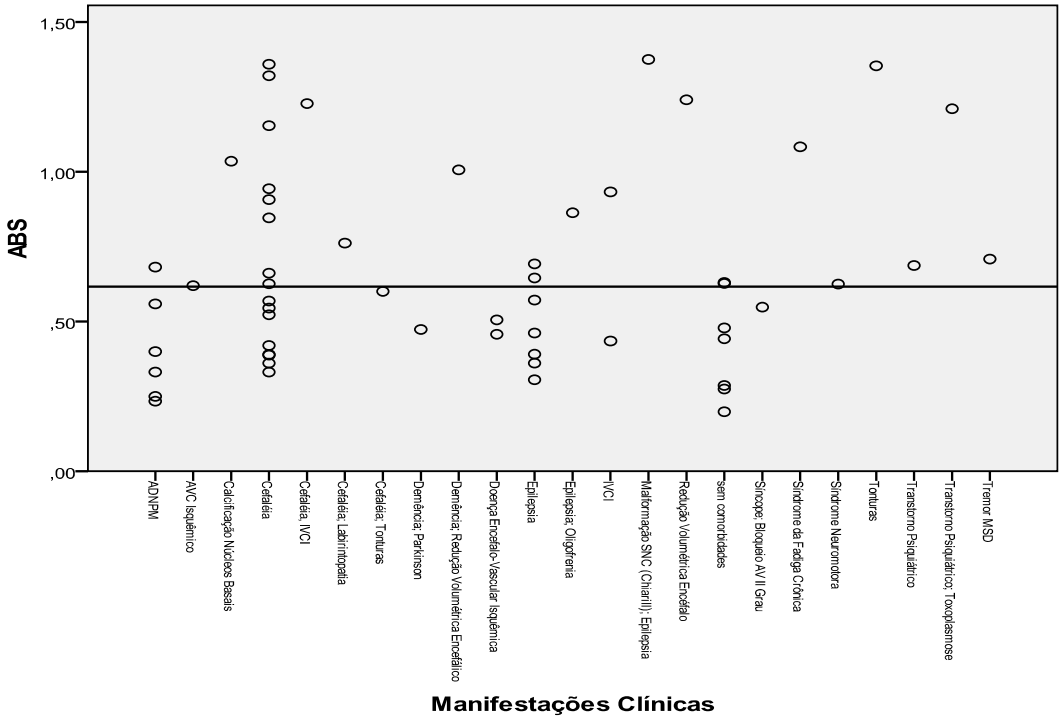


Figura 4.13. - Gráfico de dispersão para ELISA-peptídeo relacionando as medidas de absorbâncias dos soros individuais com suas respectivas manifestações clínicas. O traço no gráfico representa o ponto de corte do experimento (cut-off = 0,617).

Observando-se a Figura 4.14., percebe-se que a maioria dos pacientes da amostra não possui nódulos cerebrais, sendo esses classificadas tanto com o diagnóstico positivo ou negativo

para NCC, de maneira homogênea. O teste classificou como negativo o indivíduo com maior numero de nódulos (7).

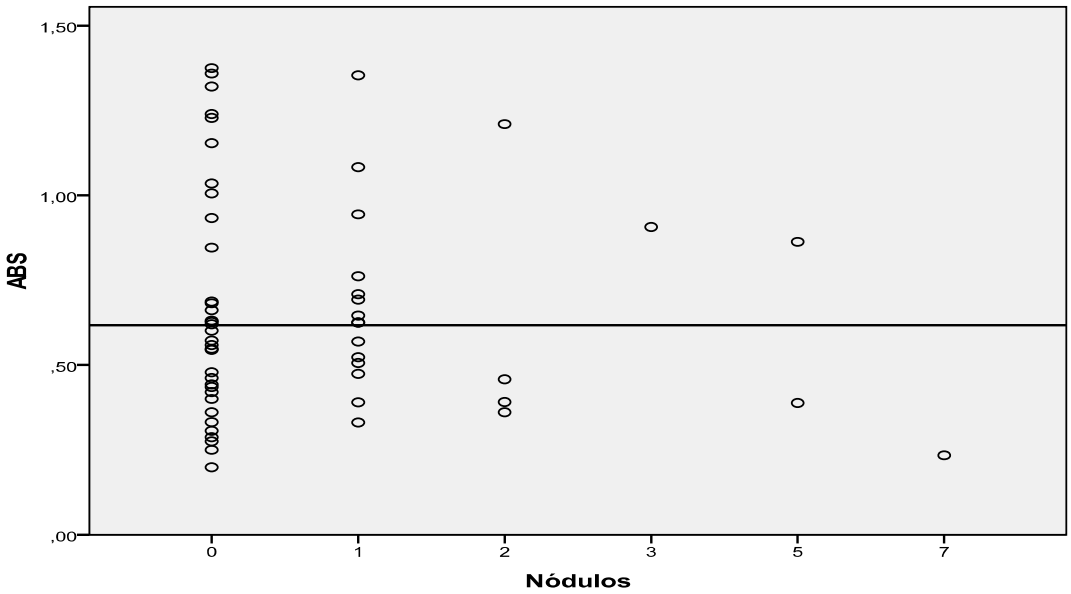


Figura 4.14. - Gráfico de dispersão para ELISA-peptídeo relacionando as medidas de absorbâncias dos soros individuais com seus respectivos números de nódulos encontrados no exame de imagem. O traço no gráfico representa o ponto de corte do experimento (cut-off = 0,617).

4.8. Análise Estatística dos Dados

4.8.1. Teste para Diferença de Proporções

Tabela 4.6. – Tabela de freqüências para teste de diferenças de proporções

	Freqüência de Erro	Freqüência Total	Estatística de Teste	Valor P
pepNCC	25	57	-0,19	**0,851**
SPACc	26	57		

Ao realizar o teste para diferença de proporções para as variáveis ELISA-peptídeo e ELISA-SPACc, percebe-se que ambas não diferem entre si quanto à proporção de erros (falso-

positivo e falso-negativo). Como o valor p encontrado (0,851) é superior ao nível de significância pré-estabelecido de 0,05, não rejeita-se a hipótese nula e pode-se afirmar que os testes são semelhantes na maneira de classificação (Tabela 4.6.)

4.8.2. Sensibilidade e Especificidade dos Testes Imunodiagnóstico ELISA-SPACc e ELISA-peptídeo

Tabela 4.7. – Parâmetros de acurácia de um teste diagnóstico

	PepNCC	SPACc
Sensibilidade	0,496	0,455
Especificidade	0,493	0,513
Falso-Positivo	0,48	0,44
Falso-Negativo	0,52	0,56

Pela análise da tabela 4.7, observa-se que a sensibilidade (função dos falsos-negativo) do teste ELISA-peptídeo é ligeiramente maior que a sensibilidade do teste ELISA-SPACc. A especificidade do teste ELISA-SPACc para essa amostra é maior, porém levando-se em consideração que não houve diferença significativa entre os testes, essa variação é, possivelmente, aleatória.

4.8.3. Curva ROC

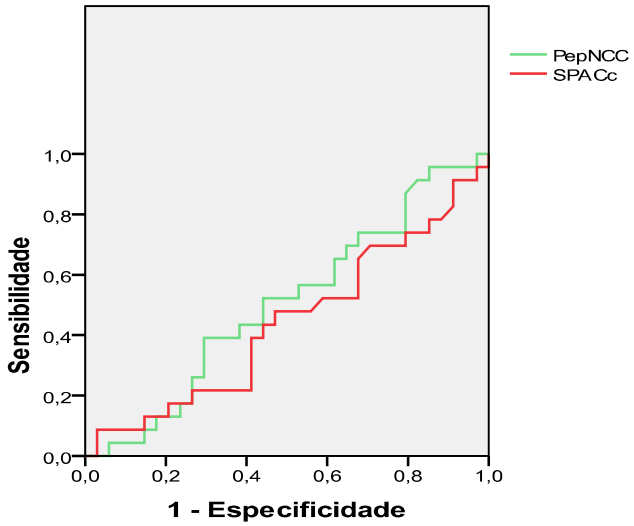


Figura 4.15. - Curva ROC para ELISA-peptídeo e ELISA-SPACc

Tabela 4.8. – Áreas abaixo das curvas ROC para ELISA-peptideo e ELISA-SPACc

Testes	Área
pepNCC	0,504
SPACc	0,441

Através da análise da Curva ROC, percebe-se que a área abaixo da curva referente a ELISA-peptídeo corresponde a 50,4% da área total e que a área abaixo da curva referente a ELISA-SPACc corresponde a 44,1% de toda a área (Fig. 4.15. e Tabela 4.8.). Assim, pode-se dizer que, o teste ELISA-peptídeo, para essa amostra específica, aparenta ser melhor que o teste de ELISA-SPACc, apesar de não existir diferença significativa entre eles.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

O complexo teníase-cisticercose possui ampla distribuição em território nacional. e nos países em desenvolvimento e, devido às migrações constantes, também nos países desenvolvidos. O predomínio da doença nas áreas urbanas reforça o que já foi e tem sido descrito em trabalhos publicados nos últimos anos (**Manreza, M.L.G.** , 1982) mostrando a inversão do que era descrito nos trabalhos mais antigos (**Takayanagui, O.M.**, 1980), fato provavelmente devido às migrações constantes do homem do campo para as cidades, e às condições em que grande parte da população vive, mesmo nas grandes metrópoles. A NCC, apesar de estar relacionada diretamente às condições sócio-econômicas insatisfatórias, já está sendo diagnosticada em pacientes de nível social e econômico mais elevado o que evidencia o total descontrole do ciclo teníase-cisticercose.

No presente estudo, enfatiza-se a necessidade do conhecimento adequado da NCC, seus aspectos clínicos, profilaxia, conduta terapêutica e os diagnósticos etiológico e diferencial, pois trata-se de doença multifacetada com grande diversidade de manifestações clínicas e geralmente sendo confundida com outras morbidades. Os exames de neuroimagem considerados como padrão-ouro para o diagnóstico da doença, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética, nem sempre são acessíveis às populações carentes. Apesar disso, grande parte de estudos epidemiológicos da NCC foram feitos com os dados obtidos dos exames de neuroimagem. Testes imunodiagnósticos, sorológicos e liquóricos, tem sido utilizados para a avaliação da prevalência e para confirmar ou excluir o diagnóstico de NCC (**Sotelo, J.** and **Del Brutto, O. H.**, 2002). Neste estudo, avaliou-se, além dos aspectos clínicos, a possibilidade de teste imunoenzimático, para o imunodiagnóstico da NCC, baseado em ensaios tipo ELISA, utilizando peptideo sintético (pepNCC) selecionado pela técnica de *Phage display*, de acordo com o protocolo descrito por Smith em 1985, com algumas

modificações (**Smith, G. P.** , 1985), com a finalidade de padronizar teste imunodiagnóstico para a NCC humana. Os resultados, apesar de inconsistentes, mostraram-se promissores.

No estudo, a análise descritiva dos dados evidencia que 60% dos pacientes (n=57) são do sexo feminino, não havendo predomínio significativo entre os gêneros. A distribuição de idades não foi homogênea, distribuindo os diversos pacientes de maneiras distintas entre as várias classes de idades. A faixa etária variou de 4 à 86 anos.

Os nódulos calcificados cerebrais, evidenciados pelos examens de imagem, apresentou freqüência muito alta de pessoas com poucos nódulos contrapondo-se a freqüência de poucos indivíduos com muitos nódulos, possivelmente devido a forma randomizada de coleta das amostras para um estudo transversal, pontual. Com relação à idade e a dispersão do número de nódulos a maior freqüência é dos pacientes cujas idades se distribuem homogeneamente, e que não evidenciaram nódulos, no exame de neuroimagem, e a menor freqüência é do paciente com o maior numero de nódulos. O número de nódulos aumenta com a idade, com exceção do último caso. Existe uma grande dispersão da idade evidenciado pelo desvio padrão da idade de 24,089 anos.

Cerca de 94,7% dos pacientes foram submetidos à TC Cerebral, 3,5% foram submetidos à TC e RNM e 1,8% à RNM. Destes, 34 (60%) tiveram diagnóstico negativo enquanto 23 (40%) foram positivos. Estes exames foram considerados padrão-ouro e do resultado deles foram retirados os pacientes para compor o grupo II do estudo subdividido em dois subgrupos; pacientes sem neurocisticercose NSS (n=34) e pacientes com neurocisticercose NCC (n=23), confirmados pelo exames de neuroimagem. O controle negativo foi formado pelos soros, rotulados com os números 27, 18, 10 e 6, de crianças do Projeto Morro Alto – Copltec/UFMG cujos exames coprológicos (HPJ) foram negativos.

Dentre as diversas manifestações clínicas encontradas (Tabela 4.5.) a mais freqüente é cefaléia (28,1%) seguida por epilepsia (13,3%). Entretanto, a maioria dos autores consideram

a forma epiléptica a mais freqüente com taxas variando entre 22% e 92% (**Gonçalves-Coelho, T.D., Coelho, M.D.G.**, 1996). Por outro lado, as cefaléias listadas na Tabela 4.5 poderiam ser manifestações clinicas de transtornos paroxísticos do SNC, ou seja, quadros epileptiformes, sendo ainda a afirmativa válida para outras manifestações descritas na Tabela tais como: tonturas, labirintopatias e transtorno psiquiátrico.

Com a finalidade de definir a concentração ótima do extrato (SPACc), como antígeno sensibilizador, a ser utilizada no teste imunodiagnóstico da NCC humana, fez-se um teste de ELISA, de acordo com o método descrito por **Chavéz-Olórtegui, C., 1991,** com o *pool* de soros dos pacientes positivos para NCC (confirmados pelo padrão-ouro) e o *pool* de soros de crianças do Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG que apresentaram exame coprológico (HPJ) negativo, com o propósito de eliminar as reações cruzadas. A melhor concentração do SPACc que diferenciou o *pool* de soros positivos do *pool* de soros negativo foi a de 0,5µg/poço (Fig. 4.7.). Utilizando essa concentração e o mesmo método fez-se uma ELISA-SPACc como teste imunodiagnóstico para a neurocisticercose humana, conforme descrito no capítulo Resultados. O gráfico da Figura 5.8. mostra que a grande maioria dos soros tendem a se associar com o diagnóstico negativo do teste, evidenciando grande número de resultados falsos-negativos, e que poucos soros apresentam um diagnóstico positivo não parecendo haver uma associação clara com os exames de neuroimagem. No diagrama de dispersão, a correlação variáveis manifestações clínicas e teste ELISA-SPACc parecem estar associadas ao diagnóstico negativo para a NCC, principalmente a manifestação clinica cefaléia. Na correlação número de nódulos e o teste ELISA-SPACc nota-se que a maioria dos pacientes sem nódulos no exame de neuroimagem apresenta diagnóstico negativo no teste, entretanto, paciente com vários nódulos tende a ser diagnosticado como negativo pelo teste.

A concentração otimizada para o peptídeo (pepNCC), como antígeno sensibilizador, para ser utilizada no teste imunodiagnóstico da NCC humana, foi feita à partir de *pool* de

soros dos pacientes positivos para NCC, confirmados por neuroimagem, juntamente com *pool* de soros das crianças do Projeto Morro Alto, Coltec/UFMG com os exames coprológicos (HPJ) negativos. O teste de ELISA foi feito de acordo com o método descrito por **Boarino *et al.,* 2005,** que permitiu melhor fixação do peptídeo sintético à placa de microtitulação. A melhor concentração utilizada, que melhor diferenciou o *pool* de soros positivos do *pool* de soros do controle negativo, foi a de 1,25ng/poço. No teste ELISA-pepNCC 45,6% dos soros associam-se com o diagnóstico positivo enquanto que 54,4% associam-se ao diagnóstico negativo, não parecendo haver uma associação com os exames de neuroimagem. No diagrama de dispersão do teste ELISA-pepNCC as manifestações clinicas; ADNPM, epilepsia e ausência de comorbidades são as variáveis mais associadas com o diagnóstico negativo. Cefaléia, a manifestação mais freqüente, gera diagnósticos negativos e positivos de forma homogênea. Com relação ao teste de ELISA-pepNCC e o número de nódulos os pacientes são classificados de forma homogênea tanto para o diagnóstico positivo como para o negativo. Foi classificado como negativo o paciente com o maior número de nódulos.

A análise estatística dos dados foi baseada no teste para diferença de proporções que, em resumo, testa a hipótese nula de igualdade entre as proporções contra a hipótese alternativa de diferença entre as mesmas. No estudo a diferença de proporções para as variáveis ELISA-pepNCC e ELISA-SPACc não diferem entre si, quanto à proporção de erros (falso-positivo e falso-negativo) e o valor de **p=0,851**, encontrado, é superior ao nível de significância pré-estabelecido, **p=0,05**. Desta forma a hipótese nula não pode ser rejeitada, sendo os testes semelhantes na maneira de classificação. A sensibilidade (função dos falsos-negativo), do teste ELISA-pepNCC é ligeiramente maior que a do teste ELISA-SPACc que possui, contudo, especificidade maior. Como não houve, no teste para diferença de proporções, diferença significativa entre os testes, essa variação pode ser aleatória.

Quando um novo teste para diagnóstico é desenvolvido, torna-se necessário avaliar a sua habilidade em classificar corretamente os pacientes em dois subgrupos clinicamente relevantes: positivo e negativo. Atualmente, existe um método para avaliar o desempenho de testes de diagnóstico que é analise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (**Metz, C.**, **2003**). A metodologia da curva ROC é baseada na hipótese de que é possível saber com certeza à qual dos grupos, "positivo" ou "negativo" um paciente pertence. Essa certeza é obtida por um procedimento conhecido como padrão-ouro (**Metz, C.** , 1978). No estudo a área abaixo da curva referente à ELISA-pepNCC corresponde à 50,4% da área total e a área abaixo da curva referente à ELISA-SPACc corresponde à 44,1% de toda a área, evidenciando que o teste ELISA-pepNCC é melhor que o teste ELISA-SPACc, nessa amostra especifica, apesar de não existir diferença significativa entre eles.

O número elevado de resultados falsos-negativos pode ser devido, neste estudo, ao estágio nodular-calcificado da NCC dos pacientes da amostra, outro fator seria o relacionado a ausência de resposta inflamatória local sem nível circulante detectável de anticorpos específicos no soro ou, ainda, altas taxas de imunoglobulinas liquóricas e baixas no soro. Os resultados falsos-positivos podem ser devidos a cisticercose em outras vísceras ou musculos, fora do SNC, ou mesmo devido à teníase, o que elevaria o nível de imunoglobulinas circulantes no soro, ou ainda, a reatividade cruzada entre anticorpos de diferentes formas de nosologias. Outro fator à ser considerado, que poderia estar falseando os resultados do estudo, seria os soros para o controle negativo do experimento. Estes soros foram obtidos de crianças com exames coprológicos (HPJ) negativos porém oriundas de área endêmica para a NCC. Apesar dos exames coprológicos não evidenciarem teníase poderia haver cisticercose fora do sistema nervoso central.

Conclusão

6 – CONCLUSÃO

6.1. O complexo teníase-cisticercose deve ter notificação compulsória para se estabelecer os verdadeiros índices epidemiológicos da doença.

6.2. A prevalência da NCC, no Brasil, não deve ser subestimada ou negligenciada pelos órgãos de saúde estatal ou federal. Os programas de prevenção, profilaxia, esclarecimento e educação da população devem ser colocados em prática, sob pena dessa patologia (mais uma) permanecer endêmica.

6.3. A conduta terapêutica, apesar de bem estabelecida por protocolos viáveis, merece ser reavaliada e estruturada.

6.4 O *Phage display* mostrou ser técnica relevante para selecionar um epitopo (linear ou conformacional), já descrito na literatura, para o imunodiagnostico da NCC.

6.5. O peptídeo selecionado por *Phage display* e sintetizado manualmente (estratégia *F-moc*) possui atividade antigênica

6.6. As inconsistências nos resultados do estudo, provavelmente, foram devidas à baixa qualidade das amostras, principalmente as do controle negativo.

6.7. Como **perspectivas**, novos estudos devem ser feitos com aumento do número de amostras, melhora da qualidade (ausência de viés) principalmente das amostras do controle negativo do experimento, visando obter padronização adequada de teste imunodiagnóstico para a NCC humana.

Referências Bibliográficas

7 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P., Szifre, B. . *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington: OPS/OMS. 989p, 1986

Agapejev, S. . Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.38(3): 207-216. 1996

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

Akiguchi, I., *et al.* Intramedullary spinal cysticercosis. *Neurology*, v.29: p. 1531 - 1534, 1979.

Alarcon, G. T., Olivares, L.L. Cisticercosis cerebral. Manifestaciones clínicas em um medio de alta prevalencia. Rev. Invest. Clin. 1975. v.27: p. 209 - 215, 1975

Alberts, B., *et al.* *Molecular Biology of the Cell. 4.Ed., Garland Publishing, Inc., 1294p*, 1997

Altschul, S.F., *et al.* . Basic local alignment search tool. . *J. Mol. Biol.,*, v.215: p. 403 - 410, 1990.

Aluja, A., Vargas, G. . *La histopatologia de la cisticercosis porcina. In: Flisser, A.; Malagon, F. Cisticercosis humana y porcina*. México: Editorial Limusa SA. p 147 - 155, 1989

Alvarez, G. G. I Curso de Especialização em Epidemiologia Aplicada às Doenças Transmitidas por Alimentos. Convenio DDTHA/CVE, FSP/USP, USP, São Paulo, 2000.

Bandres, J., White, A. C., Samo, T. et al. Extraparenchymal neurocysticercosis: report of five cases and review of the literature on management. *Clin. Infect. Dis.* , v.15: 799 - 822, 1992.

Bickerstaff, E.R., Cloake, P.C.P., Hughes, B., et al. The racemose form of cerebral cysticercosis. *Brain; 75: 1 - 16*, 1952.

Bittencourt, P.C.T., *et al*. Neurocisticercose. *www.neurologia.ufsc.br*, 2007.

Bittencourt, P.R., *et al.* Phenytoin and carbamazepine decreased oral bioavailability of praziquantel. . *Neurology* v.42: p. 492 - 496, 1992.

Boarino, A., *et al.*, Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,* p 647-653, May 2005.

Brasil, M. A. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29/03/1952, alterado pelo Decreto nº 1.255, de 25/06/1962) Brasilia. p.174p, 1980.

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: p248-254, 1976.

Canelas, H.M. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clinicas. . *Arq. Neuropsiquiatria. 20: p. 1 - 16*, 1962.

Carrada-Bravo, T. . Teniasis-cisticercosis como problema de salud pública. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, v.44, n.7, p.p.427-434, 1987.

Centers for Disease Control and Prevention. (1993). Recomendations of the International Task Force for Disease Eradication IITFDE). MMWR. 42: p. 1 - 25.

Chávez-Olórtegui, C., *et al.*, In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. 1: *Vaccine.* 9(12): 907-910, 1991 Dec.

Chávez-Olórtegui, C., *et al.* Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. *Clin. Immun.*, v.doi: 10.1016/j.clim. 2008. 10.012, 2009.

Cohen, S.N. . The manipulation of genes. *Scientifc American*, v.233: (1) p. 25 - 33. 1975

Colli, B. O., Valença, M.M., Carlotti Jr, C.G., *et al.* . Spinal cord cysticercosis: neurosurgical aspects. *Neurosurg. Focus. 12: p. 1 - 7*, 2002.

Colli, B.O., Carlotti Jr., C.G. Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da cisticercose do SNC. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP*, 2003.

Cruz, M. E., Cruz, I., Preux, P. M., *et al*. Headaches and cysticercosis in Ecuador, South America. *Headache*, v.35: p. 93 - 97, 1995.

De Ghetaldi, L.Dl, *et al.* Cerebral cysticercosis treated biphasically with dexamethasone and praziquantel. . *Ann. Intern. Med.* , v.99: p. 179 - 181, 1983.

Del Brutto, O. H., *et al.* Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*, v.57: 177-183, 2001.

Del Brutto, O.H. Neurocysticercosis. *Rev. Neurol.*, v.29:(5), p.456 - 466, 1999.

Del Brutto, O.H. . Prognostic factors for seizure recurrence after withdrawal of antiepileptic drugs in patients with neurocysticercosisl. *Neurology*, v.44: p. 1706 - 1709, 1994.

Del Brutto, O.H., Santibañez, R., Noboa, C.A., *et al.* Epilepsy due to neurocysticercosis: analysis of 203 patients. *Neurology. 42: p. 389 - 392*, 1992.

Del Brutto, O.H., Sotelo, J., Roman, G.C. *Neurocysticercosis: A Clinical Handbook*. Exton, PA: Swets & Zeitlinger, 1998

Escobar, A. . *Cysticercosis of the central nervous system.*: Springfield IL, Charles C. Thomas, 1983

Escobedo, F., *et al.* Albendazole therapy for neurocysticercosis. . *Arch. Intern. Med.* , v.147: p. 738 - 741, 1987.

Estañol, B., Kleriga, E., Loyo, M., *et al.* Mechanisms of hydrocephalus in cerebral cysticercosis: implications for therapy. *Neurosurgery*, v.13: p. 119 - 123, 1983.

Fleury, A., et al. Neurocysticercosis: validity of ELISA after storage of whole blood and cerebrospinal fluid on paper. . *Trop. Med. Int. Health. 6: p. 688 - 693*, 2001.

Flisser, A. . Overview of immunology. *Arc. Med. Res.* , v.28(1): 145 - 147, 1997.

Flisser, A., *et al.* The immunology of human and animal cysticercosis: a review. . *Bull. World Health Organ*, v.57: p. 839 - 856, 1979.

Forlenza, O.V., Filho A. H. G. V., Nobrega, J. P. S., *et al.* Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, v.62: p. 612 - 616, 1997.

Garcia - Garcia, M. L., *et al.* Prevalence and risk of cysticercosis and teniasis in a urban population of soldiers and their relatives. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.61: p. 386 - 389, 1999.

Garcia, H. H., Del Brutto, O. H. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v.14(1): p. 97 - 119, 2000.

Garcia, H.H., *et al.* Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. Rev.* , v.15: p. 747 - 756, 2002.

Garcia, H.H., *et al.* *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet*, v.Vol. 361. 2003

Gemmel, M. *et al.* Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. *Genevu : World Health Organization*, p.207, 1983.

Gemmell, M.A. A critical approach to the concepts of control an eradication of echinococcosis/hydatidosis and teniasis/cysticercosis. *Intern. J. Parasitol.*, v.17: 2, p.465-472, 1987.

Gonzalez, A. E., *et al.* Vacination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, v.72, n.6, p.837 - 9, 2005.

Goodman, K., Carpio, A., Ballagh, S.A. Case-control study of seropositivity for cysticercosis in Cuenca, Ecuador. *J. Neurol. Sci. 150, S326*, 1997.

Grau, E., Garrido, F., Cañedo, L. . *Calcification of the cysticerci of Taenia solium in the human brain. In: Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* . New York: Academic Press, p 499 - 515, 1982

Hell, R.C.R., *et al.*, Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage display. *Clin. Immun.* v.doi: 1016/j.clim.2008.20.912, 2009

Honda, P.M., Coelho, M.G. . Cisticercose espinhal. Relato de caso, revisão bibliográfica e comentários sobre a fisiopatologia. *Arq. Bras. Neurocir.* , v.5: p. 123 - 137, 1986.

Huggins, D. . Teníases. *Pediatria Moderna*, v.24, n.6, p.p.251-256, 1989.

Kaff, N.S., *et al.* Transcriptional and pstranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science*, v.279: p. 2113 - 2115, 1998.

Kishchenko, G., *et al.* Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.*, v.241:, p.208 - 213, 1994.

Kramer, L.D., *et al.* Cerebral cysticercosis: documentation of natural history by CT. . *Radiology.* , v.171: p. 459 - 462, 1989.

Larralde, C., *et al.* Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. Salud Publications. v.34: p.197 - 207.

Levav, M., *et al.* . Neurocysticercosis and performance on neuropsychologic tests: a family study in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg. 53: p. 552 - 557*, 1995.

Machado, L.R., *et al.* Computed tomography in neurocysticercosis: a 10-year long evolution analysis of 100 patients with an appraisal of a new classification *Arquivos de Neuropsiquiatria. 48: p. 414 - 418*, 1990.

Maxam, A.M. & Gilbert, W. . A new method for sequencing DNA. *Proceedings of National Academy of the Science.*, v.74: p. 560 - 564, 1977.

Molinari, J.L., Tato, P. Lara-Aguilera, R. White Jr, A.C. Effects of serum from neurocysticercosis patientes on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J. Parasitol.*, v.79:, p.124 -7, 1993.

Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., Cázares, J.M.L. Depressive effect of a *Taenia solium* factor on a cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemaglutinin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* , v.84:, p.205 - 8, 1990.

Pardini, A.X., *et al.* Use of *Taenia crassiceps* antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin Diagn Lab Immunol. 9: p. 190 - 193*, 2002.

Pfuetzenreiter, M.R. Aspectos sócio-culturais e econômicos de pacientes com diagnóstico preliminar de cisticercose cerebral em Lages, Santa Catarina, Brasil. *Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). 131p. Centro de Ciências da Saúde, Florianopolis, Universidade Federal de Santa Catarina*, 1997.

Rabiela, M.T., et al. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: Flisser, A., et al. Cysticercosis: present state of knowledge and perpspectives. . *New York: Academic Press*, p.179-200, 1982.

Rey, L. *Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do home nas Américas e na África*. Segunda Edição. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 1991

Rey, L. *Parasitologia*. 3ª Edição Editora Guanabara Koogan, 2001

Rey, L. . *Cisticercose humana. In: Rey, L. Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. p. 438 - 446, 1991

Rey, L. *As bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 349p, 1992

Rodrigues Jr, V., *et al.* Interleukin - 5 and interleukin - 10 the major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz. J. Med. biol. Res. 33:, p. 1059 - 1065*, 2000.

Román, G. *et al.* A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of the World Health Organization*, v.78(3): p. 399 - 406 2000.

Rubin, G.M. Comparing species. *Nature*, v.409: p. 820 - 821, 2001.

Sadler, T. W. *Langman - Embriologia Médica.* . Rio de Janeiro. : Editora Guanabara Koogan. 8º Edição (traduzida). p. 256 - 262, 2001

Salgado, P., *et al.* Cysticercosis. Clinical classification based on imaging studies. *Arch. Intern. Med.* , v.157: p. 1991 - 1997, 1997.

Salinas, R., Prasad, K. . Drugs for treating neujrocysticercosis (tapeworm infection of the brain) (Cochrane review). . *The Cochrane Library, Issue 1. Oxford: Update software.* http://www.updateusa.com/cochrane.htm, 1999.

Salud, Organizacion Panamericana de la. Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis en America Latina *Washington : OPS/OMS*, 1994.

Sanger, F., *et al.* DNA sequencing with chain terminating inhibitors. . *Proceedings National Academy of the Science.*, v.74: p. 5463 - 5467, 1977.

Schantz, P.M. . *Cysticercosis in non-endemic countries: the example of the United States. In: Garcia, H.H., Martinez, S. (Eds.), Teniasis:Cysticercosis por T. solium.*: Editorial Universo S.A., Lima, pp. 277 - 286, 1996

Sciutto, E., *et al.* The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology.*, v.29: p. 621 - 636, 2007.

Sciutto, E., *et al.* Taenia solium disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Micorbes Infect. v.2: p. 1875 - 1890, 2000.

Shandera, W. X., White, A. C. Jr., Chen, J., *et al.* Cysticercosis in Houston , Texas: a report of 112 cases. *Medicine*, v.73: p. 37 - 52, 1994.

Singrodia, S., *et al.* Subcutaneous nodules preceding convulsions due to neural cysticercosis. . *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 74: p. 385 - 386*, 2008.

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

Smith, G.P. Surface display and peptide libraries *Gene* v.128: , p.1 - 2, 1993.

Sotelo, J. and Del Brutto, O. H. Review of neurocysticercosis. *Neurosurg Focus* v.12(6): Article 1 2002.

Sotelo, J., Guerrero, V., Rubio, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Archives of Internal Medicine. 145: p. 442 - 445*, 1985.

Takayanagui, O. M. et Leite, J. P. . Neurocysticercosis. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* v.34(3): 283-290. 2001

Takayanagui, O.M. *Neurocisticercose: profilaxia. In: Machado, L.R., Livramento, J.A., Spina-França, A., Nóbrega, J.P.S. editor. Neuroinfecção 96*. São Paulo: Clinica Neurológica do HC/FMUSP; p. 235 - 243 1996

Takayanagui, O.M., Jardim, E. . Aspectos clínicos da neurocisticercose: análise de 500 casos. *Arq. Neuropsiquiatria. 41: p. 50 - 63*, 1983.

Trelles, J. O., Cáceres, A., Palomino, L. La cysticercose medullaire. *Rev. Neurol. 123: p. 187 - 202*, 1970.

Tsang, V. C., *et al.* An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis. 59: p. 50 - 59*, 1989.

Vasquez, M.L., *et al.* Plasma levels of praziquantel decrease when dexamethasone is given simultaneously. *Neurology.* , v.37: p. 1561 - 1562, 1987.

Venkataramana, N.K., *et al.* Intramedullary cysticercosis. *Clin. Neurol. Neurosurg. 91: p. 337 - 341*, 1989.

Wadia, N., Desai, S., Bhatt, M. Disseminated cysticercosis: new observations, including CT scan findings and experience with treatment by praziquantel *Brain*, v.111: p. 597 - 614, 1988.

Watson, J.D., *et al.* *Recombinant DNA.* : 2nd. ed. W.H. Freeman and Company. New York. 626p., 1992

Webster, R. . *Filamentous phage biology. In Phage display libraries: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000

White, A. C., Jr. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.*, v.24:, p.101-115, 1997.

White, A.C. Jr. State-of-art: neurocysticercosis: a common cause of neurologic disease worldwide. *Clin. Infect. Dis. 24: p. 101 - 113* 1997.

WHO. Control of neurocysticercosis. Provisional agenda of the 55 World Health Assembly, 5 April 2002. p. 1 - 3 2002.

Willats, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, v.50: p. 837 - 854, 2002.

Wilson, M., *et al.* Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. . *J. Inffect. Dis. 164: p. 1007 - 1009*, 1991.

Yakoleff-Greenhouse, V., *et al.* Analysis of antigenic variotin in cysticerci of *Taenia solium*. . *J. Parasitol.*, v.68(1): 39-47, 1982.

Anexos

ANEXO A - Têrmo de Consentimento Livre e Esclarecido

Número da Amostra:

Título do Estudo: **Aspectos clínicos da neurocisticercose humana e viabilidade de padronização de teste de ELISA para seu imunodiagnóstico.**

O presente estudo tem por objetivo a elaboração de teste imunodiagnóstico da neurocisticercose humana, de grande importância epidemiológica, e que devera ser utilizado nas diversas zonas endêmicas do Brasil. O projeto está sendo feito no Laboratório de Imunoquimica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em colaboração com outras instituições universitárias estrangeiras.

A cisticercose humana, especialmente a sua forma neural: a neurocisticercose (NCC), é uma doença parasitaria grave provocada pela forma larvaria do verme adulto, Taenia Solium (solitária) constituindo-se em grave problema de Saúde Pública em grupos de populações da Ásia, África, Índia e América Latina onde apresenta alta prevalência sendo, pois, necessário o desenvolvimento e padronização de diagnósticos sorológicos simples e eficazes para o controle desta temível patologia.

Sua participação neste estudo, prezado leitor, será a de fornecer 10ml de seu sangue, ou do sangue de quem você representa, sem quaisquer ônus, retirados através de punção de veia periférica com seringa e agulha estéreis e descartáveis não trazendo, em absoluto, quaisquer riscos ou danos à sua saúde. O sangue colhido será posteriormente utilizado no estudo em questão, mantendo em absolutos sigilos a identidade e dados pessoais. Além disso, o presente estudo trará novos conhecimentos e métodos mais sensíveis e específicos no diagnóstico da patologia acima citada.

Termo de Consentimento

Eu,_____, portador(a) do cartão de identidade,_____, representante legal de,_____-_____, declaro que fui informado dos propósitos e detalhes do presente estudo, acima discriminado, e entendi as informações a mim prestadas. Portanto, dou meu consentimento, ou a quem represento, de livre e espontânea vontade para ser participante deste estudo.

Local e Data:

_____

Assinatura do Participante ou seu Representante Legal

Declaro que os objetivos, finalidades e natureza do presente estudo foram cuidadosamente explicadas ao participante, tendo as informações sido passadas numa linguagem adequada, compreensível e que foi perfeitamente entendida.

Local e Data:

_____

Assinatura do Pesquisador

ANEXO - B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
MESTRADO - 2007
LABORATÓRIO DE IMUNOQUIMICA DE PROTEÍNAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA-IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FICHA DE DADOS CLÍNICOS E DE COLETA DE MATERIAL

Nº:

NOME:_____IDADE:_____

SEXO:_____NATURALIDADE:_____

ENDEREÇO:_____

TELEFONE:_____

RESUMO DA HISTÓRIA CLINICA: _____

_____

EXAMES COMPLEMENTARES:_____

COLETA DO MATERIAL: (SORO SANGUINEO)

DATA:_____HORA:_____

ROTULAR

CENTRIFUGAR

ESTOCAR À: - 20°C :

OBSERVAÇÕES: