LISANDRA AKEMI SUZUKI

RESPOSTA IMUNE HUMORAL NA NEUROCISTICERCOSE

CAMPINAS

2010

LISANDRA AKEMI SUZUKI

RESPOSTA IMUNE HUMORAL NA NEUROCISTICERCOSE

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

Projeto Financiado pela FAPESP

Processo nº 08/56811-9

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Campinas

Unicamp

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Su99r

Suzuki, Lisandra Akemi
Resposta imune humoral na neurocisticercose / Lisandra Akemi Suzuki. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neurocisticercose. 2. Anticorpos. 3. IgG. 4. IgE. 5. IgA. 6. IgM. I. Rossi, Cláudio Lúcio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Humoral immune response in neurocysticercosis

Keywords:
- Neurocysticercosis
- Antibodies
- IgG
- IgE
- IgA
- IgM

Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi
Prof. Dr. José Antônio Livramento
Prof. Dr. Hélio Rodrigues Gomes
Profa. Dra. Célia Regina Garlipp
Profa. Dra. Sílvia de Barros-Mazon

Data da defesa: 10-02-2010

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Lisandra Akemi Suzuki

Orientador: Prof. Dr. Claudio Lucio Rossi

Membros:
Prof. Dr. José Antonio Livramento
Prof. Dr. Hélio Rodrigues Gomes
Profa. Dra. Celia Regina Garlipp
Profa. Dra. Silvia de Barros Mazon

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/02/2010

DEDICATÓRIA

À Piera Silvia Prandoni

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, por todo o conhecimento e experiência adquiridos durante este trabalho.

À colega de doutorado Fernanda Santos Nascimento, pela amizade.

Aos profissionais da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, pelo suporte técnico constante e pela paciência.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Profa. Dra. Maria Heloísa Blotta, pelo apoio técnico e, principalmente, pela amizade.

Às minhas amigas Valéria Forrer, Maria Amélia Piton e Célia Ligeiro, por todo o carinho e amizade que recebo há tantos anos.

Aos meus pais, pela força que me mandam à distância.

Ao meu marido Rodrigo Bortoletto, por tanto amor e compreensão.

SUMÁRIO

Págs.

RESUMO..... ***vii***
ABSTRACT..... ***x***
LISTA DE TABELAS..... ***xiii***
LISTA DE FIGURAS..... ***xiv***
LISTA DE ABREVIATURAS..... ***xv***
1. INTRODUÇÃO..... **16**
1.1. Histórico..... **17**
1.2. Epidemiologia..... **17**
1.3. Ciclo biológico da *T. solium*..... **18**
1.4. Critérios para o diagnóstico da NC..... **20**
1.5. Diagnóstico clínico..... **21**
1.6. Diagnóstico por neuroimagem..... **21**
1.7. Resposta imune humoral..... **22**
1.8. Resposta imune humoral na NC..... **26**
1.9. Diagnóstico imunológico da NC..... **26**
2. OBJETIVOS..... **30**
3. MATERIAL E MÉTODOS..... **32**
3.1. Reagentes..... **33**
3.2. Amostras de LCR e soros..... **33**
3.3. Preparações antigênicas..... **34**
3.3.1. Obtenção dos cisticercos de *T. solium*..... **34**
3.3.2. Obtenção de líquido vesicular (LV) de cisticercos..... **34**
3.3.3. Obtenção da fração glicoprotéica de cisticercos (fração Gp)..... **35**
3.4. Determinação das concentrações ótimas dos reagentes..... **36**
3.5. Estudos de linearidade para avaliar o tempo de incubação com o substrato..... **36**
3.6. ELISA para a detecção de IgG, IgA e IgM..... **36**
3.7. ELISA para a detecção das subclasses da IgG e da IgE..... **38**
3.8. Avaliação da reatividade do conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase..... **39**
3.9. Controles positivos de LCR e soros..... **39**
3.10. Determinação da produção intratecal de anticorpos..... **40**
3.11. Análise dos dados..... **40**
4. RESULTADOS..... **41**
5. DISCUSSÃO..... **55**
6. CONCLUSÕES..... **69**
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **71**

RESUMO

A neurocisticercose (NC) é uma importante causa de doença neurológica em muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. O diagnóstico clínico da NC é dificultado pelo polimorfismo e pela não especificidade dos sintomas. As técnicas de neuroimagem e pesquisa de anticorpos específicos têm contribuído para o diagnóstico da NC e uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos dessa infecção.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de técnicas imunoenzimáticas (ELISA), a resposta imune humoral na NC, utilizando como preparações antigênicas o líquido vesicular (LV) e uma fração glicoproteica obtida do extrato bruto de cisticercos de *Taenia solium* (*T. solium*) com afinidade por lentil-lectina (fração Gp). Cinquenta e seis amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), 22 de pacientes com NC e 34 de pacientes com outros problemas neurológicos, foram utilizadas para a pesquisa de IgG e suas subclasses, com os seguintes resultados: IgG-LV: 100% de sensibilidade e especificidade; IgG_1-LV: 72,73% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgG_2-LV: 81,81% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgG_3-LV: 59,09% de sensibilidade e 97,06% de especificidade; IgG_4-LV: 90,91% de sensibilidade e 97,06% de especificidade; IgG-fração Gp: 90,91% de sensibilidade e 97,06% de especificidade; IgG_1-fração Gp: 59,09% de sensibilidade e 91,18% de especificidade; IgG_2-fração Gp: 68,18% de sensibilidade e 94,12% de especificidade; IgG_3-fração Gp: 36,36% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgG_4-fração Gp: 86,36% de sensibilidade e 100% de especificidade. Quarenta e sete amostras de LCR, 16 de pacientes com NC e 31 de pacientes com outros problemas neurológicos foram utilizadas para a pesquisa de IgE, com os seguintes resultados: IgE-LV e IgE-fração Gp: 93,75% de sensibilidade e 100% de especificidade. Cinquenta e sete amostras de soros, 22 de pacientes com NC, 18 de pacientes com outras infecções e 17 de pessoas presumivelmente sadias, foram utilizadas para a pesquisa da IgG e suas subclasses, IgE,

IgA e IgM, com os seguintes resultados: IgG–LV: 100% de sensibilidade e especificidade; IgG_1-LV: 86,36% de sensibilidade e 94,28% de especificidade; IgG_2-LV: 90,91% de sensibilidade e 97,14% de especificidade; IgG_3-LV: 86,36% de sensibilidade e 97,14% de especificidade; IgG_4-LV: 100% de sensibilidade e de especificidade; IgG-fração Gp: 95,45% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgG_1-fração Gp: 63,64% de sensibilidade e 94,28% de especificidade; IgG_2-fração Gp: 68,18% de sensibilidade e 97,14% de especificidade; IgG_3-fração Gp: 54,54% de sensibilidade e 88,57% de especificidade; IgG_4-fração Gp: 90,91% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgE-LV: 90,91% de sensibilidade e 97,14% de especificidade; IgE-fração Gp: 86,36% de sensibilidade e 100% de especificidade; IgA-LV: 54,54% de sensibilidade e 94,28% de especificidade; IgA-fração Gp: 13,63% de sensibilidade e 100% de especificidade. Anticorpos IgM não foram detectados com as preparações de LV e fração Gp. Nossos resultados mostraram que, com ambas as preparações antigênicas, tanto em amostras de LCR quanto em amostras de soros, a maior positividade foi obtida na detecção de anticorpos das classes IgG e IgE, seguida da positividade da IgA. Anticorpos IgM não foram detectados em amostras de soros com reações de ELISA realizadas com LV e fração Gp. Com relação às subclasses da IgG, a IgG_4 apresentou, tanto em amostras de LCR como em amostras de soros, valores de positividade e concentração iguais ou superiores às outras subclasses. As reações ELISA realizadas com LV mostraram sensibilidades iguais ou superiores àquelas obtidas com a fração Gp. Considerando a complexidade e o custo final da obtenção da fração Gp, o LV pode ser considerado mais adequado para a pesquisa de anticorpos em amostras de LCR e soros de pacientes com NC.

Palavras-chaves: anticorpos, IgG, subclasses da IgG, IgE, IgA, IgM, neurocisticercose.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) is an important cause of neurological disease in many developing countries, including Brazil. The clinical diagnosis of NC is hindered by the polymorphism and non-specificity of the symptoms. Neuroimaging techniques and detection of specific antibodies have contributed to the diagnosis of NC and a better understanding of the physiopathological processes of this infection. The purpose of this study was to evaluate the humoral immune response in NC by using immunoenzymatic techniques (ELISA) in which vesicular fluid (VF) and a glycoprotein fraction purified from a crude extract of *Taenia solium* cysticerci with affinity for lentil-lectin (fraction Gp) were used as antigenic preparations. Fifty-six cerebrospinal fluid (CSF) samples, 22 from patients with NC and 34 from patients with other neurological disorders, were assayed for IgG and IgG subclasses, with the following results: IgG-VF: 100% sensitivity and specificity, IgG_1-VF: 72.73% sensitivity and 100% specificity, IgG_2-VF: 81.81% sensitivity and 100% specificity, IgG_3-VF: 59.09% sensitivity and 97.06% specificity, IgG_4-VF: 90.91% sensitivity and 97.06% specificity, IgG-fraction Gp: 90.91% sensitivity and 97.06% specificity, IgG_1-fraction Gp: 59.09% sensitivity and 91.18% specificity, IgG_2-fraction Gp: 68.18% sensitivity and 94.12% specificity, IgG_3-fraction Gp: 36.36% sensitivity and 100% specificity, IgG_4-fraction Gp: 86.36% sensitivity and 100% specificity. Forty-seven CSF samples, 16 from patients with NC and 31 from patients with other neurological disorders, were assayed for IgE, with the following results: IgE-VF and IgE-fraction Gp: 93.75% sensitivity and 100% specificity. Fifty-seven serum samples, 22 from patients with NC, 18 from patients with other infections and 17 from presumably healthy individuals, were assayed for IgG, IgG subclasses, IgE, IgA and IgM, with the following results: IgG-VF: 100% sensitivity and specificity, IgG_1-VF: 86.36% sensitivity and 94.28% specificity, IgG_2-VF: 90.91% sensitivity and 97.14% specificity, IgG_3-VF: 86.36% sensitivity and 97.14% specificity, IgG_4-VF:100% sensitivity and specificity, IgG-fraction Gp: 95.45% sensitivity and 100% specificity, IgG_1-

fraction Gp: 63.64% sensitivity and 94.28% specificity, IgG_2-fraction Gp: 68.18% sensitivity and 97.14% specificity, IgG_3-fraction Gp: 54.54% sensitivity and 88.57% specificity, IgG_4-fraction Gp: 90.91% sensitivity and 100% specificity, IgE–VF: 90.91% sensitivity and 97.14% specificity, IgE-fraction Gp: 86.36% sensitivity and 100% specificity, IgA-VF: 54.54% sensitivity and 94.28% specificity, IgA-fraction Gp: 13.63% sensitivity and 100% specificity. No specific IgM antibodies were detected with VF and fraction Gp antigenic preparations. These results show that with the two antigenic preparations the highest positivity in CSF and serum samples was obtained for IgG and IgE antibodies, followed by positivity for IgA. No IgM antibodies were detected in serum samples assayed with VF and fraction Gp. With regard to IgG subclasses, IgG_4 positivity and concentration in CSF and serum samples were higher than or equal to the other subclasses. ELISA reactions done with VF showed equal or higher sensitivities than those obtained with fraction Gp. Considering the complexity and high cost of obtaining fraction Gp, VF could be more suitable for detecting specific antibodies in CSF and serum samples from patients with NC.

Keywords: antibodies, IgG, IgG subclasses, IgE, IgA, IgM, neurocysticercosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Pág.
1.	Reatividade da anti-IgG humana marcada com peroxidase.....	**42**
2.	Desempenho das reações ELISA para a IgG e suas subclasses com as preparações antigênicas LV e fração Gp.....	**47**
3.	Desempenho das reações ELISA para a IgG, IgE e IgA com as preparações antigênicas LV e fração Gp.....	**53**
4.	Reatividade cruzada nas reações ELISA.....	**54**

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.	Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com a preparação antigênica LV. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,220; IgG_1 = 0,495; IgG_2 = 0,514; IgG_3 = 0,272; IgG_4 = 0,770.....	**43**
2.	Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com a preparação antigênica fração Gp. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,090; IgG_1 = 0,318; IgG_2 = 0,410; IgG_3 = 0,116; IgG_4 = 0,728.....	**44**
3.	Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com a preparação antigênica LV. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,236; IgG_1 = 0,680; IgG_2 = 0,857; IgG_3 = 0,464; IgG_4 = 0,900.....	**45**
4.	Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com a preparação antigênica fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,128; IgG_1 = 0,489; IgG_2 = 0,741; IgG_3 = 0,282; IgG_4 = 0,789.....	**46**
5.	Resultados da pesquisa de anticorpos IgE em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,556; Gp = 0,609.....	**49**
6.	Resultados da pesquisa de anticorpos IgE em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,343; Gp = 0,312.....	**50**
7.	Resultados da pesquisa de anticorpos IgA em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,449; Gp = 0,491.....	**51**
8.	Resultados da pesquisa de anticorpos IgM em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,491; Gp = 0,630.....	**52**

LISTA DE ABREVIATURAS

DO	Densidade ótica
ELISA	Reação imunoenzimática, técnica imunoenzimática
FFMS	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Gp	Fração glicoprotéica
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
Ig	Imunoglobulina
ISNC	Pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LV	Líquido vesicular
NC	Neurocisticercose
ODN	Pacientes com outras desordens neurológicas
PM	Peso molecular
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema nervoso central
SST	Solução salina tamponada
SST-T	SST contendo 0,1% de Tween 20
SST-T-SAB	SST-T contendo 0,1% de soroalbumina bovina
TA	Temperatura ambiente
TC	Tomografia computadorizada
TMB	Tetrametilbenzidina
T. crassiceps	*Taenia crassiceps*
T. saginata	*Taenia saginata*
T. solium	*Taenia solium*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A neurocisticercose (NC), infecção causada pela presença de cisticercos de *Taenia solium* (*T. solium*) no sistema nervoso central (SNC) humano tem sido reconhecida como uma das mais graves doenças neurológicas, sendo um importante problema de saúde pública em regiões onde as condições sanitárias não são adequadas (Del Brutto e Sotelo, 1988; Spina-França et al., 1993; Agapejev, 1996; Sciutto et al., 2000; White, 2000; Carpio, 2002; Garcia et al., 2006).

O nome *cysticercus* foi dado por Laennec, derivado das palavras gregas *kistic*, significando vesícula, e *kerkos*, significando cauda (Nieto, 1982). A primeira referência ao cisticerco é creditada a Aristophanes (456-380 A.C) que em uma de suas comédias faz referência às vesículas cheias de fluido encontradas em línguas de porcos. Em sua *História dos Animais*, Aristóteles (384-322 A.C), discorrendo sobre doença de porcos, descreveu com precisão estas vesículas (Foster, 1965; Nieto, 1982). Paranoli é normalmente citado como o primeiro autor a descrever, em 1550, a presença dessas vesículas no homem. Em 1558, Gessner e Rumler publicaram o primeiro caso onde cisticercos foram encontrados na dura-máter de uma pessoa epiléptica (Nieto, 1982). Kückenmeister, em 1855, e Leuckart, em 1856, mostraram o relacionamento dos cisticercos com a *T. solium* (Foster, 1965; Nieto, 1982).

1.2. Epidemiologia

A distribuição da NC é universal, sendo freqüente em muitos países da América Latina, incluindo o Brasil, alguns países da Europa Oriental e em populações não-muçulmanas da África e sudeste da Ásia, onde condições ecológicas, sócio-econômicas e culturais permitem a sua disseminação e persistência (Sciutto et al., 2000; Carpio, 2002; Kraft, 2007; Sciutto et al., 2007). Observa-se também uma freqüência elevada em algumas regiões dos EUA onde há alta concentração de imigrantes provenientes de

regiões endêmicas (Wallin e Kurtzke, 2004; Sorvillo et al., 2007). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) na década passada indicavam que cerca de 50 milhões de pessoas estavam infectadas com os cisticercos da *T. solium*, com 50.000 óbitos anuais atribuídos à NC (Schantz et al., 1993).

No Brasil, os estudos epidemiológicos da NC se restringem, na maioria das vezes, a alguns estados das regiões sudeste e sul que possuem centros de estudo de neurologia avançados. Este fator, aliado ao descaso quanto à implantação da obrigatoriedade da notificação compulsória da doença, contribui para que os dados epidemiológicos se mantenham subestimados (Agapejev, 2003).

Vários trabalhos têm mostrado as elevadas taxas de letalidade da NC (0,2% a 7,5%) e ressaltado o alto custo dos atendimentos aos pacientes (Spina-França, 1956; Canelas, 1962; Takayanagui e Jardim, 1983; Machado et al., 1988; Spina-França et al., 1993).

1.3. Ciclo biológico da *T. solium*

No ciclo biológico da *T. solium*, o homem é o único hospedeiro definitivo conhecido, abrigando o parasita em seu intestino na sua forma adulta e eliminando para o meio ambiente ovos maduros ou até mesmo proglotes inteiras nas fezes. O porco atua como hospedeiro intermediário, ingerindo alguns desses ovos, que se desenvolvem em cisticercos, sobretudo nos tecidos da musculatura esquelética estriada, cérebro e fígado. Quando o homem consome carne de porco crua ou mal-cozida contendo cisticercos, estes se rompem, se ancoram às paredes do intestino delgado pelos acúleos do escólex e ali se desenvolvem em vermes adultos, que podem atingir até 7 m de comprimento e produzir proglotes que podem conter até 50.000 ovos cada. Este ciclo caracteriza a teníase. Na cisticercose, o homem atua como o hospedeiro intermediário, ao ingerir ovos de *T. solium* presentes em água ou alimentos (verduras e frutas) ou por auto-infecção

(fecal-oral, ou, mais raramente, por peristalse reversa). No sistema digestivo, os ovos são rompidos por fluidos gástricos e intestinais e liberam os embriões hexacantos, que penetram a mucosa intestinal e atingem a corrente sanguínea, sendo transportados para diferentes tecidos, onde se desenvolvem em cisticercos. Os parasitas podem se localizar em lugares onde não produzem sintomas, tais como músculos e tecido subcutâneo. No entanto, a presença de cisticercos no SNC, que caracteriza a NC, pode causar diversos problemas neurológicos (Sciutto et al., 2000; Sotelo e Del Brutto, 2000; Takayanagui e Leite, 2001; Carpio, 2002).

Após um período que pode variar de meses a anos, o cisticerco freqüentemente entra em processo de degeneração, com conseqüente fibrose e calcificação. A evolução do cisticerco pode ser dividida em quatro estágios. No primeiro estágio, conhecido como vesicular, o cisticerco é formado por uma vesícula de membrana fina preenchida por um líquido, contendo no seu interior o escólex invaginado. O início da degeneração do parasita, seja ela natural ou precipitada pelos mecanismos imunológicos do hospedeiro, caracteriza o estágio coloidal, observando-se degeneração da membrana vesicular, opacificação do líquido contido no seu interior e sinais de degeneração hialina. No estágio seguinte, granular nodular, o cisto começa a diminuir de tamanho, suas paredes tornam-se espessadas e seu conteúdo transforma-se em granulações grosseiras, em conseqüência da deposição de sais de cálcio. Na fase final, estágio nodular calcificado, o cisticerco apresenta tamanho bastante reduzido em relação ao primeiro estágio, encontrando-se totalmente calcificado (Carpio et al., 1998; Noujaim et al., 1999; Sotelo e Del Brutto, 2000; Carpio, 2002).

1.4. Critérios para o diagnóstico da NC

Del Brutto et al. (2001) propuseram quatro categorias de critérios para o diagnóstico da NC (absolutos, principais, secundários e epidemiológicos) e dois graus de certeza diagnóstica (diagnóstico definitivo e diagnóstico provável).

Critérios absolutos: demonstração histológica do parasita em biópsia de lesão cerebral ou de medula espinhal, lesões císticas mostrando o escólex do parasita em estudos de neuroimagem e visualização direta de parasitas subretinais em exames fundoscópicos.

Critérios principais: lesões altamente sugestivas de NC em estudos de neuroimagem, resultado sorológico positivo na reação de *Imunoblot* utilizando como preparação antigênica glicoproteínas do parasita com afinidade por lentil-lectina (Tsang et al., 1989), resolução de lesões císticas intracranianas após terapia com albendazol ou praziquantel e resolução espontânea de lesão hipodensa pequena (menor que 20 mm) e única.

Critérios secundários: lesões compatíveis com NC em estudos de neuroimagem, manifestações clínicas sugestivas de NC, reações imunoenzimáticas (ELISA) positivas em amostras de LCR para detecção de anticorpos anti-cisticercos ou antígenos de cisticercos, cistos localizados fora do SNC.

Critérios epidemiológicos: evidência de contato domiciliar com portador de *T. solium*; pessoas provenientes ou que habitam áreas onde a NC é endêmica e viagens freqüentes a áreas endêmicas para a doença.

I. Diagnóstico definitivo:

1.- presença de um critério absoluto; 2.- presença de dois critérios principais mais um critério secundário e um epidemiológico.

II. Diagnóstico provável:

1.- presença de um critério principal mais dois critérios secundários; 2.- presença de um critério principal mais um critério secundário e um epidemiológico; 3.- presença de três critérios secundários mais um critério epidemiológico.

1.5. Diagnóstico clínico

As manifestações clínicas da NC são variadas e inespecíficas e dependem, entre vários fatores, do número, da localização e do estágio evolutivo dos cisticercos no SNC. As manifestações clínicas mais comuns são: crises epiléticas, hipertensão intracraniana, meningite e distúrbios psíquicos (Sciutto et al., 2000; Sotelo e Del Brutto, 2000; Takayanagui e Leite, 2001; Garcia et al., 2002; Garcia et al., 2006).

Dada a heterogeneidade dos sintomas da doença, o diagnóstico clínico da infecção é muito difícil, quando não auxiliado por dados epidemiológicos, laboratoriais e de imagem.

1.6. Diagnóstico por neuroimagem

As técnicas de neuroimagem - tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) - auxiliam o diagnóstico da NC pela visualização de estruturas compatíveis com o parasita, bem como fornecem informações sobre a evolução da infecção. A dificuldade da utilização sistemática dessas técnicas reside no seu custo elevado, com conseqüente inacessibilidade a centros de investigação de média e baixa complexidade. Além disto, as técnicas de neuroimagem podem apresentar resultados falso-negativos e/ou falso-positivos, requerendo, muitas vezes, diagnóstico diferencial por outros métodos (Del Brutto e Sotelo, 1988; Palacios et al., 1997; Garg, 2002).

Antes do advento das técnicas de neuroimagem, a classificação da NC era comumente baseada na sintomatologia (Canelas, 1962), que se mostrou de uso limitado, devido à variedade e inespecificidade das manifestações clínicas. Sotelo et al. (1985)

propuseram uma classificação baseada no estágio evolutivo dos cistos em estudos de neuroimagem e em sinais inflamatórios na análise do LCR, como indicadores de imunidade ativa contra o parasita. Com base nesses critérios, a NC foi classificada em duas formas, ativa e inativa. Na forma ativa da infecção, cistos vesiculares ou em degeneração são circundados por uma evidente reação inflamatória no tecido cerebral adjacente, acompanhada de anormalidades liquóricas, como pleocitose e aumento de gamaglobulinas. Na forma inativa, são encontradas apenas lesões calcificadas sugestivas e a resposta imune do hospedeiro é apenas residual.

1.7. Resposta imune humoral

A imunidade humoral é mediada por anticorpos cujas principais funções biológicas são a neutralização e eliminação de microorganismos (bactérias, fungos, vírus) e parasitas, muitas vezes com a participação de células fagocitárias e componentes do sistema complemento. O padrão da resposta imune humoral em várias doenças infecciosas e parasitárias vem sendo estudado há muitos anos, numa tentativa de melhor estabelecer as funções biológicas das diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas nessas doenças.

A espécie humana possui cinco classes de imunoglobulinas, IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, sendo as classes IgA e IgG constituídas por duas (IgA_1 e IgA_2) e quatro subclasses (IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4), respectivamente. As classes e subclasses de imunoglobulinas são identificadas por suas propriedades físico-químicas e biológicas. Em pessoas adultas normais, a IgG_1 é a imunoglobulina com maior a concentração sérica (5-12 g/L), seguida pela IgG_2 (2-6 g/L), IgA_1 (0,5-2 g/L), IgM (0,5-1,5 g/L), IgG_3 (0,5-1 g/L), IgG_4 (0,2-1 g/L), IgA_2 (0-0,2 g/L), IgD (0-0,4 g/L) e IgE (0-0,002 g/L) (Hamilton, 1987).

O reconhecimento dos determinantes antigênicos é realizado pela porção variável do anticorpo (Fab), como conseqüência de seleção clonal e maturação da afinidade,

enquanto as funções efetoras, que ocorrem após a interação do anticorpo com o antígeno, incluindo a ativação do sistema complemento e a interação com receptores celulares, são mediadas pela porção constante (Fc), que também determina o isótipo das imunoglobulinas (Hamilton, 1987; Garaud et al., 2003).

A IgM, com uma meia vida de cerca de 5 dias, representa aproximadamente 13% (6%) das imunoglobulinas séricas. Os anticorpos IgM são normalmente os primeiros anticorpos produzidos durante uma resposta imune primária, sendo detectados na resposta secundária para alguns agentes infecciosos e parasitários. Graças a configuração pentamérica de suas moléculas, após a interação com antígenos, os anticorpos IgM, são capazes de ativar a via clássica do sistema complemento de modo muito eficiente, considerando que a interação com o primeiro componente do sistema, C1q, requer dois domínios apropriados, localizados na parte constante das moléculas, suficientemente próximos (Hamilton, 1987). Estudos experimentais também têm mostrado que os anticorpos IgM interagem por meio da porção Fc com receptores em macrófagos, facilitando a fagocitose (Rajan et al., 2005).

A IgG, com uma meia vida de 7 a 23 dias, dependendo da subclasse, representa aproximadamente 80% das imunoglobulinas séricas, sendo a única imunoglobulina capaz de atravessar a placenta. Os anticorpos IgG são normalmente detectados após os anticorpos IgM durante uma resposta imune primária, sendo detectados em altas concentrações na resposta secundária. Embora de modo menos eficiente do que a IgM, os anticorpos IgG também são capazes de ativar a via clássica do sistema complemento. As subclasses da IgG reagem com as moléculas de C1q em uma ordem definida, IgG_3 (40x), IgG_1 (6x), IgG_2 (1x) e IgG_4 (não detectável). Outra função efetora muito importante da IgG é a sua habilidade de se ligar, via região Fc, a receptores celulares, promovendo o reconhecimento e remoção de complexos antígeno-anticorpo e partículas ou

microorganismos estranhos por células com capacidade fagocitária, como macrófagos e monócitos. Várias outras células possuem receptores para a região Fc da IgG, incluindo linfócitos, neutrófilos, plaquetas, eosinófilos e células NK. A interação entre anticorpos e receptores de Fc (FcR) pode iniciar uma variedade de respostas, como endocitose, fagocitose, transcitose, exocitose, geração de superóxidos, citoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e liberação de mediadores de citocinas inflamatórias (Hamilton, 1987; Monteiro e van der Winkel, 2003).

A IgA, com uma meia vida de cerca de 6 dias, representa aproximadamente 6% (13%) das imunoglobulinas séricas. Os anticorpos IgA são detectados após os anticorpos IgM durante a resposta imune primária para alguns agentes infecciosos e parasitários, sendo raramente detectados na resposta secundária. Os anticorpos IgA são capazes de ativar as vias alternativa e da lectina do sistema complemento. Nas secreções mucosas (saliva, lágrimas, colostro, fluídos gastrointestinais, secreção brônquica) predomina a IgA_2 polimérica, que existe quase exclusivamente sob a forma de dímeros, unidos por um polipeptídeo, a cadeia J, ligada ao componente secretório. A IgA secretória desempenha um papel importante no sistema imune inato prevenindo os microorganismos e proteínas estranhas de penetrar superfícies mucosas. Ela também pode inibir a aderência de microorganismos, revestindo os mesmos com uma concha hidrofílica que é repelida pela glicocalix de mucina nas superfícies mucosas. Enquanto o papel da IgA secretora é bem estabelecido na imunologia das mucosas, não se conhece muito sobre a função da IgA sérica. Imunocomplexos circulantes contendo IgA podem ser removidos da circulação por fagocitose com pouca ou nenhuma inflamação. IgA polimérica e imunocomplexos contendo IgA podem desencadear funções efetoras dos leucócitos através dos receptores Fc da IgA (Monteiro e van der Winkel, 2003).

A IgD, com uma meia vida de cerca de 5 dias, representa aproximadamente 0,2% das imunoglobulinas séricas. A IgD é um dos componentes do receptor de células B. Embora seu papel na resposta imune humoral não seja claro, níveis elevados dessa imunoglobulina têm sido registrados em várias doenças, incluindo síndrome da imunodeficiência adquirida, linfoma de Hodgkin, doença de Behçet, vasculite retiniana idiopática e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Preud'homme et al., 2000).

A IgE representa aproximadamente 0,2% das imunoglobulinas séricas. Além de sua baixa concentração no soro, a IgE é catabolizada a uma taxa maior que outras imunoglobulinas, com uma meia vida de 12 h no soro. Entretanto, a meia vida da IgE ligada aos mastócitos é de 7 dias (Negrão-Corrêa et al., 2003). Esses anticorpos freqüentemente aparecem em resposta para alérgenos e antígenos parasitários, principalmente helmintos (Cooper et al., 2008). Devido à baixa concentração de IgE circulante, sua função é normalmente relacionada à receptores celulares capazes de interagir com a parte Fc da molécula de anticorpo. Receptores para a porção Fc da IgE são encontrados em mastócitos, basófilos, células de Langerhans, eosinófilos, células dendríticas e plaquetas (Negrão-Corrêa et al., 2003; Cooper et al., 2008). Hipersensibilidade imediata, a principal função conhecida da IgE in *vivo* requer a ligação da IgE para receptores de Fc sobre mastócitos e basófilos. A interação da IgE na superfície de mastócitos com o antígeno desencadeia a degranulação das células, resultando em liberação de mediadores, tais como histamina, heparina, citocinas e proteases, que induzem os sintomas característicos observados em reações alérgicas e contribuem para a inflamação crônica eosinofílica que aparece no tecido circundante (Negrão-Corrêa et al., 2003). A IgE ligada a eosinófilos por meio de sua porção Fc pode levar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (Gounni et al. 1994).

1.8. Resposta imune humoral na NC

Existem poucos estudos avaliando simultaneamente a produção de várias classes e/ou subclasses de anticorpos na NC. Nesses estudos, os anticorpos IgG são detectados com maior freqüência, seguidos por anticorpos IgM (Flisser et al., 1980; Espinoza et al., 1986; Odashima et al., 2002). Alguns estudos mostram que anticorpos IgA são detectados com maior freqüência que anticorpos IgE (Espinoza et al., 1986; Bueno et al., 2000), enquanto outros estudos mostram o contrário (Flisser et al., 1980; Grogl et al., 1985; Odashima et al., 2002). Alguns trabalhos têm mostrado detecção de anticorpos IgG_4 com alta freqüência (Yang et al.,1998; Huang et al., 2002; Intapan et al., 2008) ou simplesmente a elevação da concentração dessa classe de anticorpo (Short et al., 1990). Trabalhos do mesmo grupo de pesquisa mostraram que pacientes com NC severa apresentavam níveis aumentados de anticorpos IgG_1, IgG_2 IgG_3 e IgE em comparação com casos apresentando sintomatologia moderada (Chavarria et al., 2005) e que pacientes com NC sintomática apresentavam níveis aumentados de todas as subclasses da IgG, em contraste com os baixos níveis desses anticorpos encontrados em pacientes assintomáticos (Chavarria et al., 2006).

1.9. Diagnóstico imunológico da NC

A pesquisa de anticorpos específicos desempenha um papel importante tanto para estudos epidemiológicos como para o diagnóstico da NC, principalmente quando as técnicas de neuroimagem não estão disponíveis. A pesquisa de anticorpos na NC tem sido realizada utilizando uma variedade de técnicas, incluindo hemaglutinação passiva, imunofluorescência indireta, radioimunoensaio e reações imunoenzimáticas (ELISA, dot-ELISA, *Imunoblot*). Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos mostram uma variação marcante na eficácia das técnicas utilizadas, com sensibilidades e especificidades variando de 47% a 100% e 67% a 100%, respectivamente (Pialarissi et

al., 1987; Larralde et al., 1990; Vaz et al., 1996; Bueno et al., 2000; Peralta et al., 2002; Arruda et al., 2005; Suzuki et al., 2007). O desempenho das técnicas imunoenzimáticas tem se mostrado superior ao de outras técnicas imunológicas utilizadas para o imunodiagnóstico da infecção, com índices de sensibilidade e especificidade superiores a 90% descritos na grande maioria dos trabalhos (Tsang et al., 1989; Vaz et al., 1991; Bueno et al., 2000; Silva et al., 2000; Bueno et al., 2001; Suzuki et al., 2007).

Tsang et al. (1989) descreveram uma técnica de *Imunoblot* para o imunodiagnóstico da NC, utilizando uma preparação antigênica composta de glicoproteínas isoladas de um extrato bruto de cisticercos de *T. solium* por cromatografia de afinidade com Sepharose 4B-lentil-lectina. Na técnica originalmente descrita, foram obtidas sensibilidade e especificidade de 98% e 100%, respectivamente. Embora trabalhos subseqüentes tenham mostrado que a sensibilidade desse *Imunoblot* possa variar de 28% a 98%, dependendo do número, localização e estágio evolutivo dos cisticercos no SNC (Wilson et al., 1991), essa técnica tem sido considerada a mais confiável para o imunodiagnóstico da NC (Del Brutto et al., 2001). Entretanto, devido à complexidade na obtenção da preparação antigênica e seu alto custo, a técnica de *Imunoblot* com glicoproteinas com afinidade por lentil-lectina raramente tem sido utilizada na rotina diagnóstica.

Atualmente a técnica ELISA, desenvolvida por Arambulo et al., em 1978, tem sido o teste mais empregado para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR e soros, principalmente em conseqüência de sua alta sensibilidade. Várias preparações antigênicas têm sido utilizadas nas reações de ELISA, incluindo extratos brutos totais de cisticercos de *T. solium* e *Taenia crassiceps* e frações purificadas desses dois parasitas (Arambulo, 1978; Corona et al., 1986; Chang et al., 1988; Larralde et al., 1990; Zini et al., 1990; Garcia et al., 1995; Vaz et al., 1996; Ito et al., 1998; Bueno et al.,

2000; Arruda et al., 2005; Suzuki et al., 2007). Estudos comparativos envolvendo várias preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* têm mostrado que reações de ELISA padronizadas com o líquido vesicular desses dois parasitas apresentam alta sensibilidade e especificidade (Larralde et al., 1990; Bueno et al., 2000; Bueno et al., 2001; Arruda et al., 2005, Suzuki et al., 2007). É importante ressaltar que muitos testes imunoenzimáticos utilizados para o imunodiagnóstico da NC são qualitativos ou, no máximo, semi-quantitativos. Uma reação imunoenzimática quantitativa para a pesquisa de anticorpos específicos requer que todos os reagentes utilizados, exceto aquele sendo testado, estejam presentes em excesso. Na padronização da reação, é essencial que a atividade enzimática seja medida durante a porção linear da reação, quando a concentração do substrato é muito maior do que a concentração da enzima (Hancock e Tsang, 1986; Maddison, 1987).

Com relação ao imunodiagnóstico das neuroinfecções, como a NC, é preciso ressaltar que a presença de anticorpos no soro pode ser resultado de parasitas localizados fora do SNC, enquanto a presença de anticorpos no LCR pode ser resultado de uma disfunção da barreira hematoencefálica (Reiber e Peter, 2001).

A detecção da síntese intratecal de anticorpos específicos é um parâmetro altamente confiável para o diagnóstico de várias doenças neuro-inflamatórias e requer uma discriminação acurada entre imunoglobulinas derivadas do sangue e do SNC, qualitativamente pela detecção de anticorpos oligoclonais ou quantitativamente pela determinação da fração intratecal ou preferencialmente pela determinação do índice de anticorpos (Reiber e Peter, 2001; Sindic et al., 2001; Lejon et al., 2003). O índice de anticorpos discrimina entre anticorpos derivados do sangue e do SNC encontrados no LCR e leva em consideração mudanças na função da barreira sangue/LCR (Reiber e Lange, 1991). A demonstração da produção intratecal de anticorpos tem se mostrado útil

para o diagnóstico de várias doenças afetando o SNC, incluindo esclerose múltipla (Andersson et al., 1994; Reiber et al., 1998); encefalite toxoplásmica (Potasman et al., 1988), borreliose (Tumani et al., 1995; Halperin et al., 1996; Kaiser e Rauer, 1998), tripanosomíase africana humana (Bisser et al., 2002; Lejon et al., 2003) e NC (Miller et al., 1985; Estañol et al., 1989; Machado et al., 2002, Arruda et al., 2006).

A avaliação simultânea de anticorpos das classes IgM, IgG, IgA e IgE, bem como das subclasses da IgG, em amostras de soros e LCR poderia contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos como para o imunodiagnóstico da NC. Entretanto, até o presente momento poucos trabalhos têm avaliado simultaneamente a detecção de diferentes classes e subclasses de anticorpos na NC, sem nenhum estudo identificado onde os pacientes com NC apresentassem produção intratecal de anticorpos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resposta imune humoral na NC, analisando, por meio de técnicas imunoenzimáticas, a concentração de anticorpos específicos das classes IgG, IgE, IgA e IgM e das subclasses da IgG (IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4) em amostras de LCR e soros de pacientes com diagnóstico comprovado da infecção, utilizando como preparações antigênicas o líquido vesicular (LV) e uma fração glicoprotéica obtida do extrato bruto de cisticercos de *T. solium* com afinidade por lentil-lectina (fração Gp).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os sais, bases e ácidos utilizados para o preparo de reagentes foram da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), com grau de pureza analítica (P.A.) ou superior. Os conjugados (anticorpos de cabra anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM humanas marcados com peroxidase), os anticorpos monoclonais de camundongos anti-IgG_1, anti-IgG_2, anti-IgG_3, anti-IgG_4 e anti-IgE humanas, as imunoglobulinas IgG, IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4 humanas, soroalbumina bovina, Sepharose-4B-lentil-lectina, α-metilmanosídeo, Tween 20, fluoreto de fenilmetilsulfonila (FFMS), leupeptina, tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram da marca Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

Os reagentes para as determinações das concentrações de IgG e albumina por nefelometria foram da marca Dade Behring Siemens (Deerfield, EUA).

3.2. Amostras de LCR e soros

No presente trabalho foram utilizadas amostras biológicas dos seguintes grupos de pessoas:

I. amostras de LCR e soro de 22 pacientes com diagnóstico comprovado de NC (com idades variando de 22 a 66 anos, média de 42 anos), baseado em dados epidemiológicos, clínicos, de neuroimagem e laboratoriais. Todos os pacientes eram sintomáticos e apresentavam produção intratecal de anticorpos IgG anti-cisticercos, utilizando como preparação antigênica o líquido vesicular de cisticercos de *T. solium*.

II. amostras de LCR de 34 pacientes com outros problemas neurológicos - neurosífilis (n=5), neurocriptococose (n=8), neurotoxoplasmose (n=4), esclerose múltipla (n=5), meningite viral (n=6) e meningite bacteriana (6).

III. amostras de soros de 18 pacientes com outras infecções - sífilis (n=5), mononucleose infecciosa (n=3), citomegalovirose (n=3), hepatite A (n=2) e toxoplasmose (n=5).

IV. amostras de soros de pessoas presumivelmente sadias (n=17).

As amostras dos grupos I, II e III foram obtidas de pacientes atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP. As amostras do grupo IV foram obtidas de alunos e funcionários da UNICAMP. As amostras dos grupos II e III foram obtidas de pacientes sem evidências epidemiológica, clínica e de neuroimagem sugestivas de cisticercose. As amostras do grupo IV foram obtidas de pessoas sem evidências epidemiológica e clínica para NC.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de acordo com as resoluções da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.3. Preparações antigênicas

3.3.1. Obtenção de cisticercos de *T. solium*

Cisticercos de *T. solium* foram obtidos de porcos naturalmente infectados. Os cisticercos foram extraídos dos tecidos, com auxílio de bisturi, sendo retirado todo tecido conectivo aderido aos parasitas. Cisticercos em processo de degeneração e calcificados foram desprezados. Após várias lavagens com solução salina tamponada com fosfato (SST) 0,15M, pH=7,2, os parasitas foram acondicionados em frascos estéreis e estocados a – 80^{o}C até o momento do uso.

3.3.2. Obtenção de líquido vesicular (LV) de cisticercos

O LV foi obtido como previamente descrito (Suzuki et al., 2007). Resumidamente, cisticercos íntegros de *T. solium* foram rompidos com auxílio de agulhas em placas de Petri. O LV foi coletado com pipeta Pasteur estéril e centrifugado a 10.000xg, por 30 min a 4^{o}C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi submetido à sonicação (Sonicador Branson, modelo SX – B30), por 1 min em banho de gelo (30 s de sonicação/30 s de pausa), com tempo de pulso de 20% e potência 3. Após a sonicação, os inibidores enzimáticos FFMS e leupeptina, nas concentrações finais de 5 mM e 0,0025 mM,

respectivamente, foram adicionados ao LV e o material, após determinação da concentração de proteínas (Bradford, 1976), foi aliquotado e estocado a -80^{o}C até o momento do uso.

3.3.3. Obtenção da fração glicoprotéica de cisticercos (fração Gp)

A etapa inicial da purificação da fração Gp foi a obtenção do extrato bruto de cisticercos de *T. solium*. Alíquotas de cisticercos íntegros foram descongeladas e os parasitas ressuspendidos em SST na proporção de 1 volume de parasitas para 4 volumes de tampão. Os inibidores enzimáticos FFMS e leupeptina, nas concentrações finais de 5 mM e 0,0025 mM, respectivamente, foram acrescentados às soluções em todas as etapas da obtenção da fração Gp. A suspensão de cisticercos foi submetida à homogeneização (homogenizador Polytron), em banho de gelo, por 3 min (1 min de homogeneização/1 min de pausa), na velocidade 4. Em seguida, o material foi sonicado (Sonicador Branson, modelo SX – B30), em banho de gelo, por 3 min (1 min de sonicação/1 min de pausa), com tempo de pulso de 20% e potência 3. Após a sonicação, o material foi deixado sob agitação lenta e contínua, a 4 ^{o}C, durante 2h, e, em seguida, centrifugado a 20.000xg, a 4^{o}C, por 1h (centrífuga Sigma, modelo 2K 15, Osterode, Alemanha). O sobrenadante resultante foi removido cuidadosamente e passado através de filtros Millex® com tamanhos de poros de 0,45 μm (Millipore Corporation, Bedford, EUA). Após a determinação da concentração proteica (Bradford, 1976), o extrato bruto de cisticercos foi aliquotado e estocado a – 80^{o}C, até o momento do uso. Para a obtenção da fração Gp, o extrato bruto de cisticercos foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B-lentil-lectina, sendo aplicado 3 mg do extrato bruto de cisticercos para cada ml de resina. A coluna e o extrato bruto de cisticercos foram equilibrados com tampão fosfato 0,05M, NaCl 0,2M, pH=8.0 (tampão de equilíbrio) e as glicoproteínas com afinidade para lentil-lectina foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo 0,2M de α-

metilmanosídeo. O eluato obtido foi concentrado em dispositivo de ultrafiltração com filtros capazes de reter moléculas com peso molecular superior a 10.000 daltons (Millipore Corporation, Bedford, EUA). Após diálise com SST e determinação da concentração de proteínas (Bradford, 1976), a fração Gp foi aliquotada e estocada a –80^{o}C até o momento do uso.

3.4. Determinação das concentrações ótimas dos reagentes

As reações imunoenzimáticas (ELISA) foram padronizadas usando quantidades em excesso de todos os reagentes, exceto aquele sendo testado. Para a titulação das preparações antigênicas, quantidades crescentes de antígeno (0,1 a 8 μg de proteína/ml) foram usadas. Para a determinação das concentrações ótimas dos conjugados, as cavidades das placas de poliestireno foram revestidas com diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas humanas (IgG, IgG_1, IgG_2, IgG_3 IgG_4, IgE, IgM e IgA) e quantidades crescentes dos mesmos (1/64.000 a 1/125) foram usadas.

3.5. Estudos de linearidade para avaliar o tempo de incubação com o substrato

Para avaliar o melhor tempo de incubação com o sistema substrato, foram realizadas reações de ELISA com LV e fração Gp, variando os tempos de incubação com o substrato de 1 a 30 min.

3.6. ELISA para detecção de IgG, IgA e IgM

As cavidades das placas de poliestireno fundo em U (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram sensibilizadas com 100 μl das preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium*, diluídas a 4 μg de proteína/ml em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M, pH=9,6. Após um período de incubação por 1h à temperatura ambiente (TA) e por 16h a 4^{o}C, em repouso, as cavidades das placas foram lavadas duas vezes com 200 μl de SST contendo 0,1% de Tween 20 (SST-T). Em seguida, às cavidades das

placas foram adicionados 100 μl de SST-T contendo 0,1% de soroalbumina bovina (SST-T-SAB) e as placas foram incubadas por 30 min, à TA. Após o período de incubação e mais duas lavagens com SST-T, 100 μl das amostras de soros (diluídas a 1/75 para IgG e IgA e 1/225 para IgM, em SST-T) ou LCR (diluídas a 1/5 para IgG, em SST-T) foram adicionados, em duplicata, às cavidades das placas revestidas com as preparações antigênicas, LV ou fração Gp. Para a pesquisa de IgA as amostras de soros foram previamente absorvidas com *RF Absorbent* (Dade Behring Siemens, Deerfield, EUA). Em todas as placas de reação foram colocados controles de soro e LCR positivos e negativos para a IgG e controles de soro positivo e negativo para a IgA. Após um período de incubação com os soros por 1h, à TA, as cavidades das placas foram lavadas três vezes com SST-T e às mesmas acrescentados 100 μl de conjugado (anticorpos de cabra anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humana marcados com peroxidase, diluídos, respectivamente, a 1/800, 1/3.000 e 1/1.000, em SST-T). Após incubação da placa por 1h, à TA, seguida de 3 lavagens das suas cavidades com SST-T, foram acrescentados às mesmas 100 μl do sistema substrato, composto de TMB e H_2O_2, diluídos em tampão acetato-ácido acético 0,1M, pH=5.5. Após incubação da placa por 10 min, à TA, no escuro, as reações foram bloqueadas com 50 μl de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N. As leituras das absorbâncias das reações foram feitas a 450,630 nm, em leitora de ELISA (Labsystems, modelo Multiskan MS, Finlândia).

O índice J (Youden, 1950) foi calculado para diferentes níveis de reatividade, em termos de densidade ótica (D.O.), aplicando a seguinte fórmula: J = (a/b) + (c/d) – 1, onde, **a** = número de pacientes com NC apresentando resultado positivo, **b** = número total de pacientes com NC, **c** = número de indivíduos não infectados por NC com resultado negativo e **d** = número total de indivíduos não infectados. A D.O. que produziu o maior índice J foi utilizada como valor de *cut-off*.

3.7. ELISA para detecção das subclasses da IgG e da IgE

As cavidades das placas de poliestireno fundo em U (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram sensibilizadas com 100 μl das preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium*, diluídas a 4 μg de proteína/ml em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M pH=9,6. Após um período de incubação por 1h à TA e por 16h a 4°C, em repouso, as cavidades das placas foram lavadas duas vezes com 200 μl de SST-T. Em seguida, às cavidades das placas foram adicionados 100 μl de SST-T-SAB e as placas foram incubadas por 30 min, à TA. Após o período de incubação e mais duas lavagens com SST-T, 100 μl das amostras de soros (diluídas a 1/75 para as subclasses da IgG e 1/15 para a IgE, em SST-T) ou LCR (diluídos a 1/5 para as subclasses da IgG e 1/2 para a IgE, em SST-T) foram adicionados, em duplicata, às cavidades das placas revestidas com as preparações antigênicas, LV ou fração Gp. Para a pesquisa de IgE as amostras de LCR e soro foram previamente absorvidas com *RF Absorbent* (Dade Behring Siemens, Deerfield, EUA). Em todas as placas de reação foram colocados controles de soro e LCR positivos e negativos para a as subclasses da IgG e IgE. Após um período de incubação por 1h, à TA, as cavidades das placas foram lavadas três vezes com SST-T e às mesmas acrescentados 100 μl dos anticorpos monoclonais de camundongos específicos para as quatro subclasses (anti-IgG_1, anti-IgG_2, anti-IgG_3 ou anti-IgG_4 humana diluídos a 1/750, em SST-T) e para a IgE (anti-IgE humana, diluído a 1/1.000, em SST-T). Após um período de incubação por 1h, à TA, as cavidades das placas foram lavadas 3 vezes com SST-T e as mesmas acrescentados 100 μl do conjugado (anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo marcados com peroxidase) diluído a 1/1.000 em SST-T. Após incubação da placa por 1h, à TA, seguida de 3 lavagens das suas cavidades com SST-T, foram acrescentados às mesmas 100 μl do sistema substrato, composto de TMB e H_2O_2 diluídos em tampão acetato-ácido acético 0,1M, pH=5.5. Após incubação da placa por 10

min, à TA, no escuro, as reações foram bloqueadas com 50 μl de H_2SO_4 2N. As leituras das D.O. das reações foram feitas a 450,630 nm, em leitora de ELISA (Labsystems, modelo Multiskan MS, Finlândia). Os valores de *cut-off* foram determinado pelo índice J (Youden, 1950), como previamente descrito.

3.8. Avaliação da reatividade da anti-IgG humana marcada com peroxidase

Na pesquisa de anticorpos da classe IgG foi utilizado como conjugado anticorpos de cabra anti-IgG humana marcados com peroxidase. Para avaliar a reatividade desse conjugado, placas de ELISA foram revestidas com diferentes concentrações de imunoglobulinas IgG_1, IgG_2, IgG_3 ou IgG_4 (0,25 a 4 μg de proteína/ml). Após um período de incubação por 1h, à TA, as cavidades das placas foram lavadas 3 vezes com SST-T e às mesmas acrescentados 100 μl do conjugado diluído a 1/800 em SST-T. Após incubação da placa por 1h, à TA, seguida de 3 lavagens das suas cavidades com SST-T, foram acrescentados às mesmas 100 μl do sistema substrato, composto de TMB e H_2O_2 diluídos em tampão acetato-ácido acético 0,1M, pH=5.5. Após incubação da placa 10 min, à TA, no escuro, as reações foram bloqueadas com 50 μl de H_2SO_4 2N. As leituras das D.O. das reações foram feitas a 450,630 nm, em leitora de ELISA (Labsystems, modelo Multiskan MS, Finlândia).

3.9. Controles positivos e negativos de LCR e soros

Em todas as reações de ELISA, foram aplicados controles positivo e negativo de LCR ou soro, seguindo as mesmas diluições padronizadas para as amostras. O controle positivo de LCR foi obtido misturando-se partes iguais de LCR de 6 pacientes com NC, todos apresentando níveis significativos de anticorpos anti-cisticercos, detectados por ELISA. O controle negativo de LCR foi obtido misturando-se partes iguais de LCR de 6 pacientes, sem dados epidemiológicos, clínicos, de imagem e laboratoriais para NC.

Procedimento idêntico foi seguido para a obtenção dos controles positivo e negativo de soro.

3.10. Determinação da produção intratecal de anticorpos

As dosagens de albumina e IgG em amostras de LCR e soro foram realizadas por nefelometria (Nefelômetro BN Prospect, Dade Behring Siemens). As concentrações de anticorpos no soro e LCR foram determinadas usando a técnica de ELISA.

As seguintes fórmulas foram utilizadas:

$Q_{específico\ IgG}$ = [Anticorpo LCR]/[Anticorpo soro]

Q_{Alb} = [Alb LCR]/[Alb soro]

Q_{IgG} = [IgG LCR]/[IgG soro]

$Q_{lim(IgG)} = [0{,}93 \times \sqrt{QAlb^2 + 0{,}000006}\ ] - 0{,}0017$

Se $Q_{IgG} < Q_{lim(IgG)} \Rightarrow$ Indice de anticorpos IgG = $Q_{específicoIgG}/Q_{IgG}$

Se $Q_{IgG} > Q_{lim(IgG)} \Rightarrow$ Indice de anticorpos IgG = $Q_{específicoIgG}/Q_{lim(IgG)}$

Índice de anticorpos IgG $\geq$ 1,5 indica síntese intratecal de anticorpos (Reiber e Peter, 2001; Lejon et al., 2003).

3.11. Análise dos dados

As sensibilidades e especificidades das reações ELISA e as medianas dos resultados obtidos com essas reações foram comparadas usando os testes de Cochran e de Mann-Whitney, respectivamente (Conover, 1971; Fleiss, 1981). Valores de $p \leq 0{,}05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Experimentos de titulação das preparações antigênicas definiram que as menores concentrações desses reagentes que produziram reatividade máxima foram alcançadas com 2 µg de proteína/ml. Todas as reações ELISA foram realizadas usando concentrações de LV e fração Gp com 4 µg de proteína/ml.

Experimentos de titulação dos conjugados definiram as menores concentrações desses reagentes que produziram a máxima reatividade. O dobro dessas concentrações definiu o título dos conjugados empregados nas reações de ELISA.

Na pesquisa de anticorpos da classe IgG, anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase foi utilizado como conjugado. A reatividade desse conjugado para as diferentes concentrações de imunoglobulinas IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4 é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Reatividade* da anti-IgG humana marcada com peroxidase

imunoglobulina	Concentração da imunoglobulina (µg de proteína/ml) utilizada para o revestimento das placas de ELISA		
	4	**1**	**0,25**
IgG_1	1,221	0,941	0,755
IgG_2	1,232	1,042	0,901
IgG_3	1,231	1,012	0,843
IgG_4	1,275	1,010	0,808

* **Resultados expressos em DO.**

Como pode ser observado, o conjugado foi capaz de reconhecer anticorpos das subclasses IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4 de modo similar, em concentrações de imunoglobulinas variando de 0,25 a 4 µg de proteína/ml.

Estudos de linearidade mostraram que as taxas de conversão do substrato foram lineares por 15 min. Todos os testes de ELISA foram realizados com tempos de incubação com o sistema substrato por 10 min à TA.

Os pacientes com NC apresentaram índices de anticorpos variando de 2,2 a 21,01 (média= 9,7).

Cinquenta e seis amostras de LCR, 22 de pacientes com NC e 34 de pacientes com outras desordens neurológicas [neurosífilis (n=5), neurocriptococose (n=8), neurotoxoplasmose (n=4), esclerose múltipla (n=5), meningite viral (n=6) e meningite bacteriana (6)], foram utilizadas para a pesquisa de IgG e suas subclasses e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados, respectivamente, nas Figuras 1 e 2.

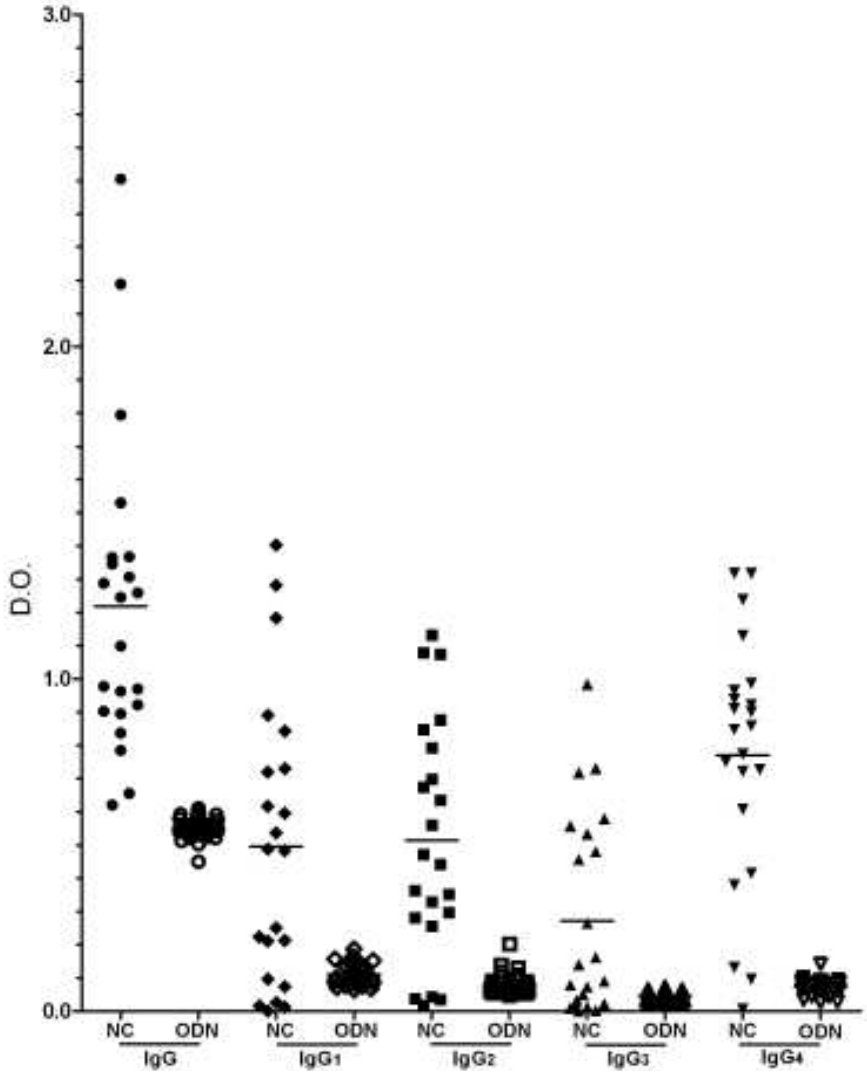

Fig.1. Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com a preparação antigênica LV. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,220; IgG_1 = 0,495; IgG_2 = 0,514; IgG_3 = 0,272; IgG_4 = 0,770.

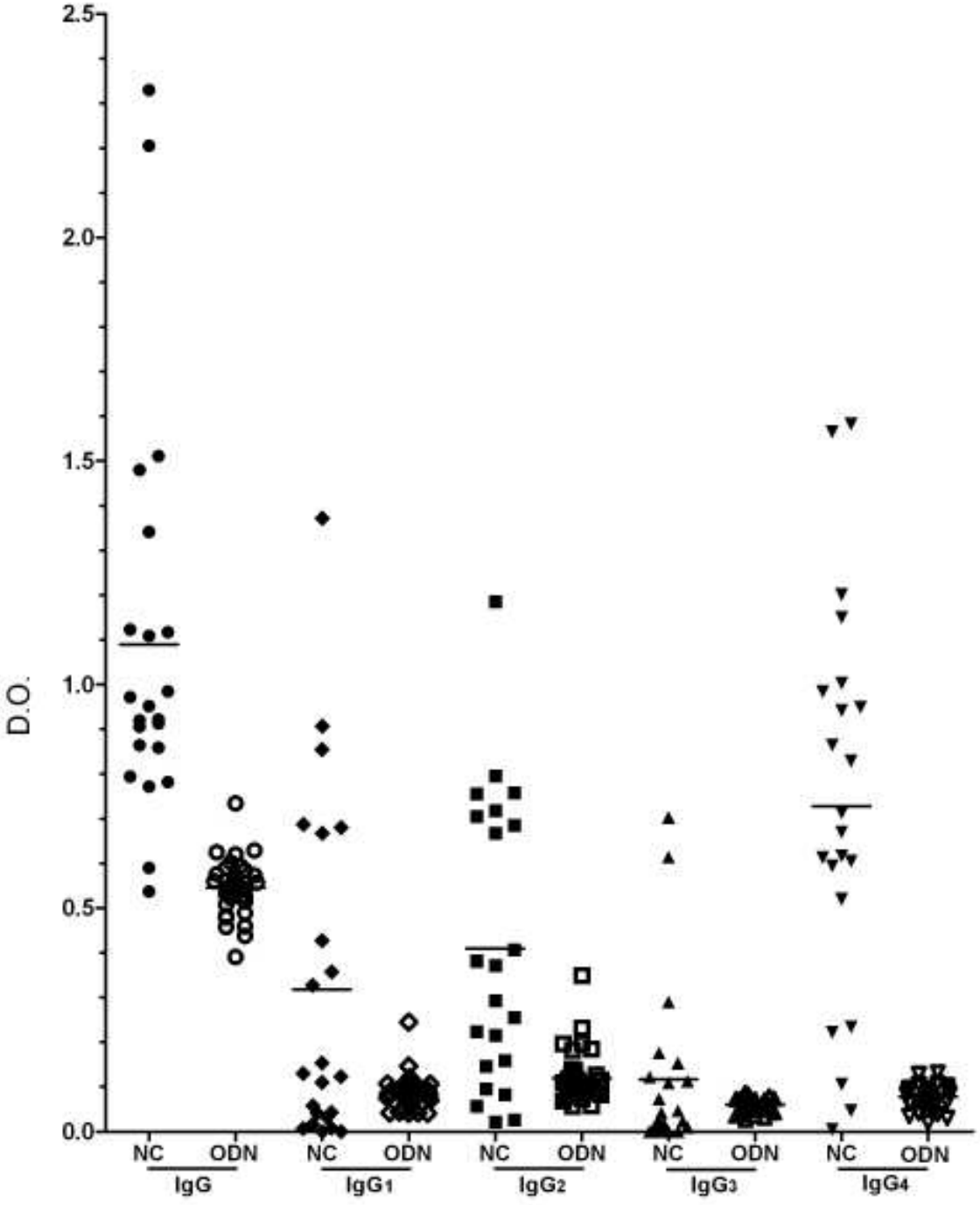

Fig 2. Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com a preparação antigênica fração Gp. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,090; IgG_1 = 0,318; IgG_2 = 0,410; IgG_3 = 0,116; IgG_4 = 0,728.

Cinquenta e sete amostras de soros, 22 de pacientes com NC, 18 de pacientes com outras infecções [sífilis (n=5), mononucleose infecciosa (n=3), citomegalovirose (n=3), hepatite A (n=2), toxoplasmose (n=5)] e 17 de pessoas presumivelmente sadias foram utilizadas para a pesquisa de IgG e suas subclasses e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados, respectivamente, nas Figuras 3 e 4.

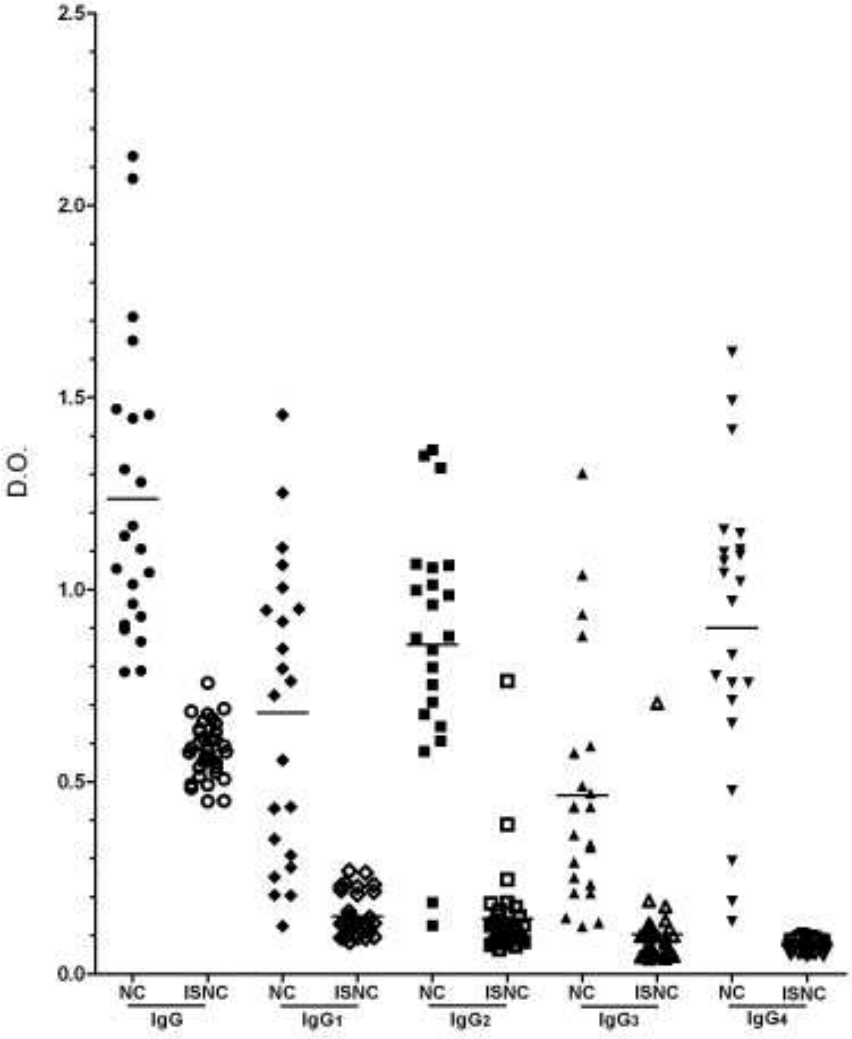

Fig 3. Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com a preparação antigênica LV. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,236; IgG_1 = 0,680; IgG_2 = 0,857; IgG_3 = 0,464; IgG_4 = 0,900.

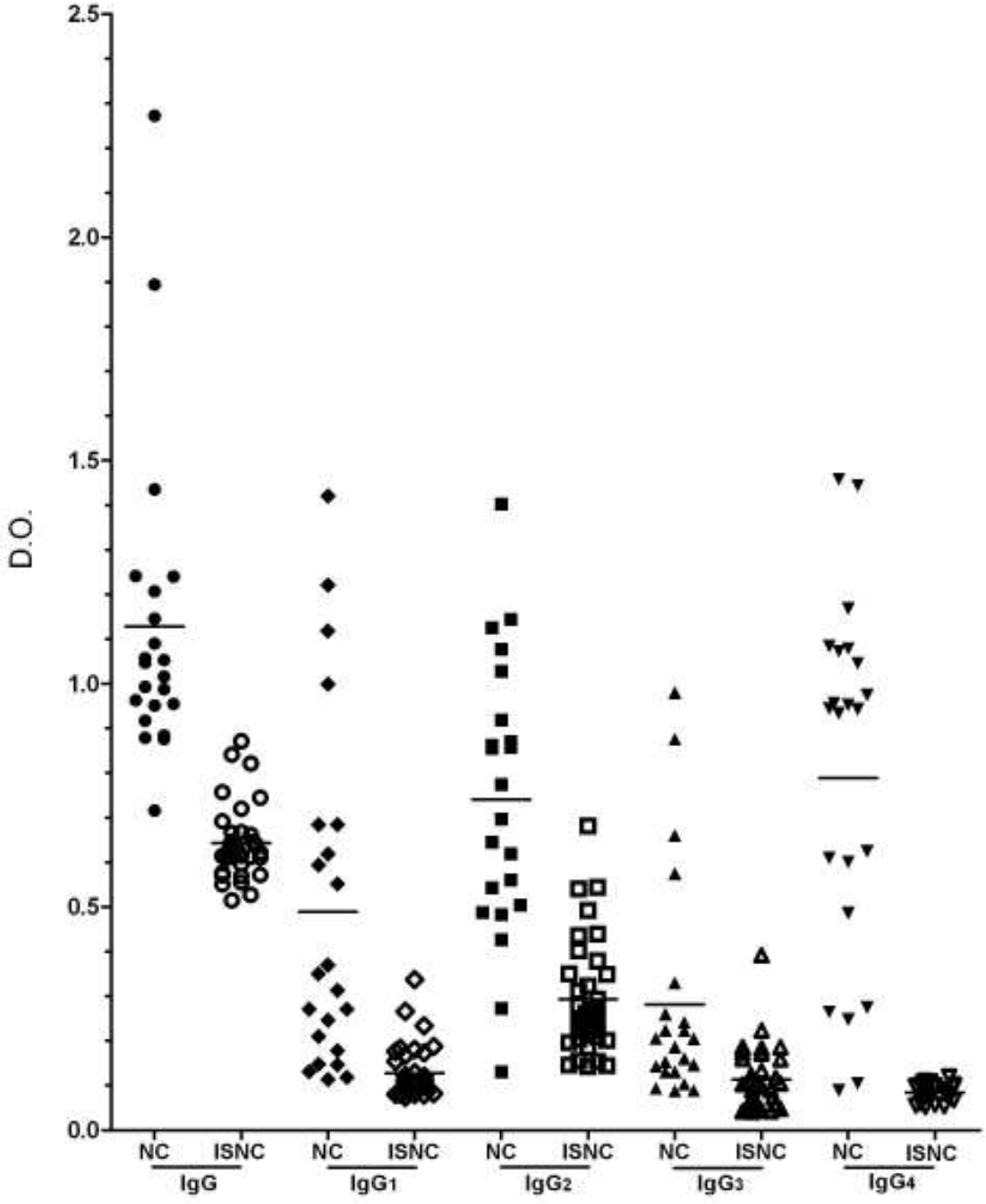

Fig 4. Resultados da pesquisa de anticorpos anti-cisticercos em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com a preparação antigênica fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: IgG = 1,128; IgG_1 = 0,489; IgG_2 = 0,741; IgG_3 = 0,282; IgG_4 = 0,789.

Com base nestes resultados, as sensibilidades e especificidades da IgG e suas subclasses para as preparações antigênicas LV e fração Gp, bem como as medianas de cada reação de ELISA, são representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Desempenho das reações ELISA para a IgG e suas subclasses com as preparações antigênicas LV e fração Gp.

	LV				Fração Gp			
	LCR		soro		LCR		soro	
Anticorpo	S (%) (MD)	E%	S (%) (MD)	E (%)	S (%) (MD)	E (%)	S (%) (MD)	E (%)
IgG	100 (1,173)	100	100 (1,123)	100	90,91 (0,937)	97,06	95,45 (1,032)	100
IgG_1	72,73 (0,485)	100	86,36 (0,744)	94,28	59,09 (0,126)	91,18	63,64 (0,332)	94,28
IgG_2	81,81 (0,457)	100	90,91 (0,877)	97,14	68,18 (0,333)	94,12	68,18 (0,737)	97,14
IgG_3	59,09 (0,115)	97,06	86,36 (0,398)	97,14	36,36 (0,033)	100	54,54 (0,196)	88,57
IgG_4	90,91 (0,853)	97,06	100 (0,996)	100	86,36 (0,691)	100	90,91 (0,944)	100

S=sensibilidade; E=especificidade; MD=mediana.

Em amostras de LCR, a reação ELISA-IgG_4 apresentou maior sensibilidade que as reações ELISA-IgG_1 e ELISA-IgG_3 com LV e fração Gp, enquanto em relação à reação ELISA-IgG_2, a reação ELISA-IgG_4 apresentou maior sensibilidade somente com a fração Gp. A reação ELISA-IgG_2 apresentou maior sensibilidade que a reação ELISA-IgG_3 somente para a fração Gp, enquanto diferenças significativas não foram observadas entre as sensibilidades das reações ELISA-IgG_2 e ELISA-IgG_1, com LV e fração Gp. Em amostras de soros, a sensibilidade da reação ELISA-IgG_4 foi maior que as sensibilidades das reações ELISA-IgG_3 e ELISA-IgG_1 com a fração Gp, enquanto diferenças significativas não foram observadas entre as sensibilidades das quatro subclasses com LV e entre as sensibilidades das reações ELISA- IgG_3, ELISA-IgG_2 e ELISA-IgG_1 com a

fração Gp. Não foram encontradas diferenças significativas nas especificidades das reações ELISA realizadas com LV e fração Gp em amostras de LCR e soros para a IgG e suas subclasses.

Em amostras de LCR, o valor da mediana da reação ELISA-IgG_4 foi maior que os valores das medianas das reações ELISA-IgG_1, ELISA-IgG_2 e ELISA-IgG_3, tanto com LV como com fração Gp. Com as duas preparações antigênicas, o valor da mediana da reação ELISA-IgG_2 foi superior ao da mediana da reação ELISA-IgG_3, enquanto diferenças não significativas foram observadas entre as medianas das reações ELISA-IgG_2 e ELISA-IgG_1. Em amostras de soros, o valor da mediana da reação ELISA-IgG_4 foi maior que o valor da mediana da reação ELISA-IgG_3, tanto com LV como com fração Gp e maior que ELISA-IgG_1 com a fração Gp. Não foram encontradas diferenças significativas entre as reações ELISA-IgG_4 e ELISA-IgG_2, com as duas preparações. O valor da mediana da reação ELISA-IgG_2 foi superior ao valor da mediana ELISA-IgG_1 somente com a fração Gp.

Quarenta e sete amostras de LCR, 16 de pacientes com NC e 31 de pacientes com outros problemas neurológicos [neurosífilis (n=5), neurocriptococose (n=7), neurotoxoplasmose (n=4), esclerose múltipla (n=4), meningite viral (n=5) e meningite bacteriana (6)] foram utilizadas para a pesquisa de IgE e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados na Figura 5.

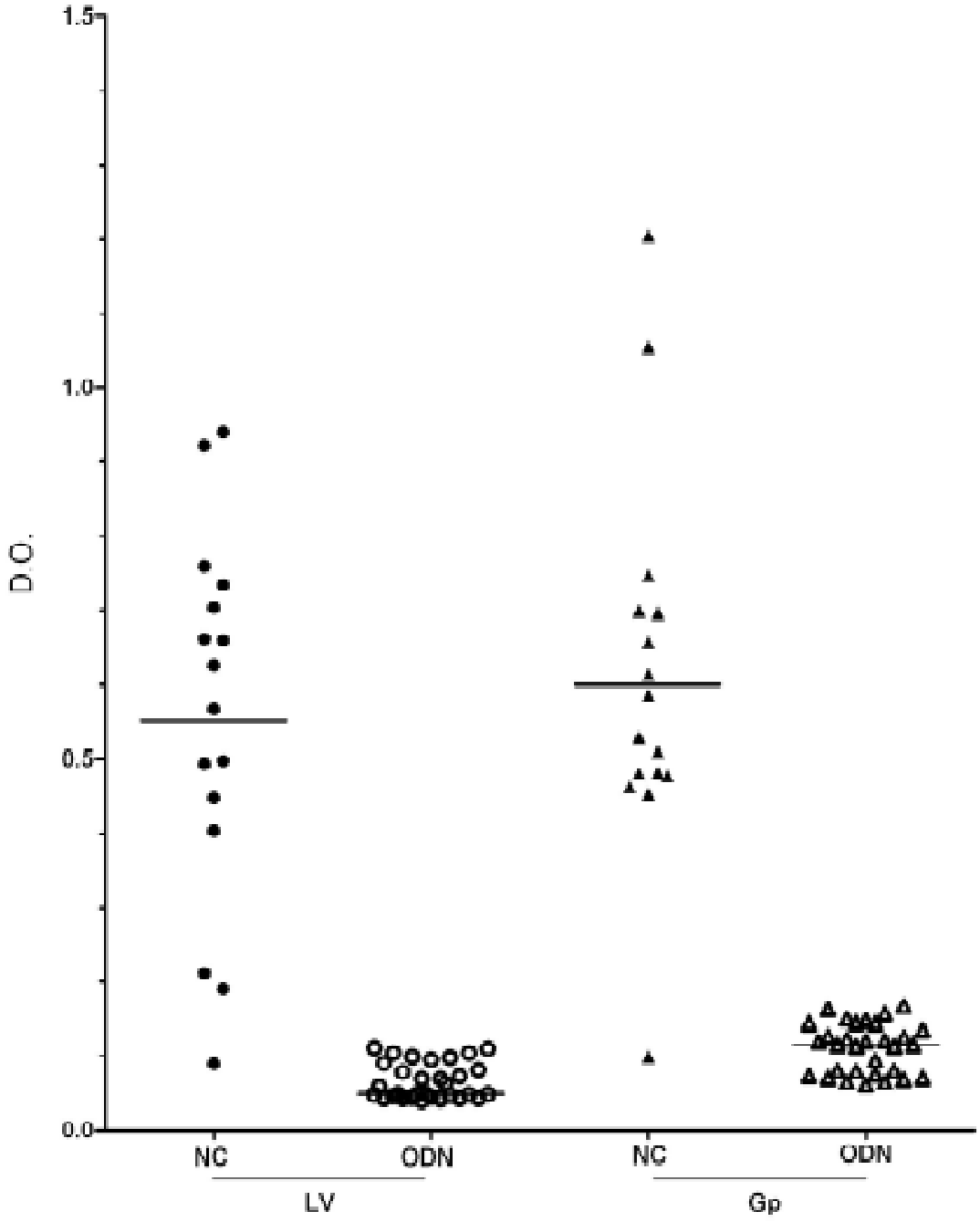

Fig 5. Resultados da pesquisa de anticorpos IgE em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e outras desordens neurológicas (ODN) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,556; Gp = 0,609.

Cinquenta e sete amostras de soros, 22 de pacientes com NC, 18 de pacientes com outras infecções [sífilis (n=5), mononucleose infecciosa (n=3), citomegalovirose (n=3), hepatite A (n=2), toxoplasmose (n=5)] e 17 de pessoas presumivelmente sadias foram utilizadas para a pesquisa de IgE e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados na Figura 6.

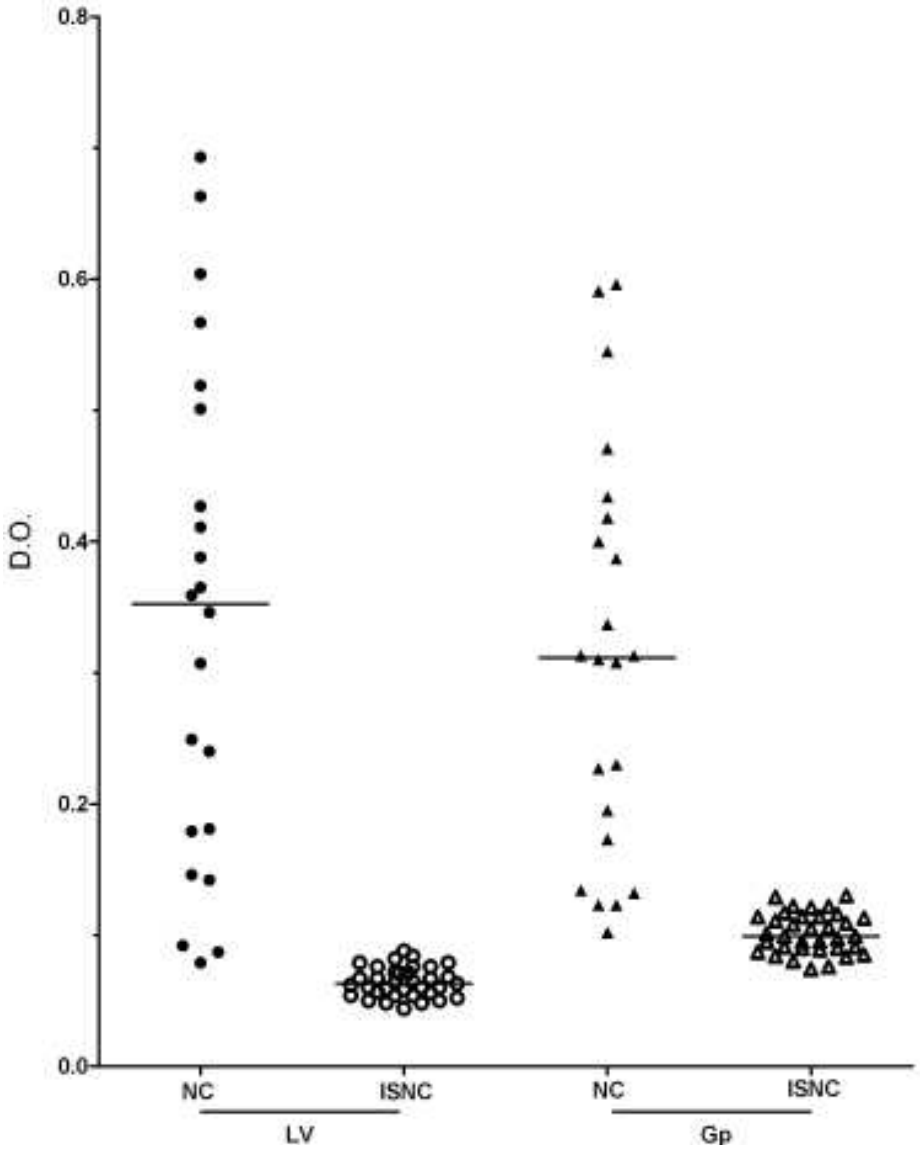

Fig 6. Resultados da pesquisa de anticorpos IgE em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,343; Gp = 0,312.

Cinquenta e sete amostras de soro, 22 de pacientes com NC, 18 de pacientes com outras infecções [sífilis (n=5), mononucleose infecciosa (n=3), citomegalovirose (n=3), hepatite A (n=2), toxoplasmose (n=5)] e 17 de pessoas presumivelmente sadias foram utilizadas para a pesquisa de IgA e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados na Figura 7.

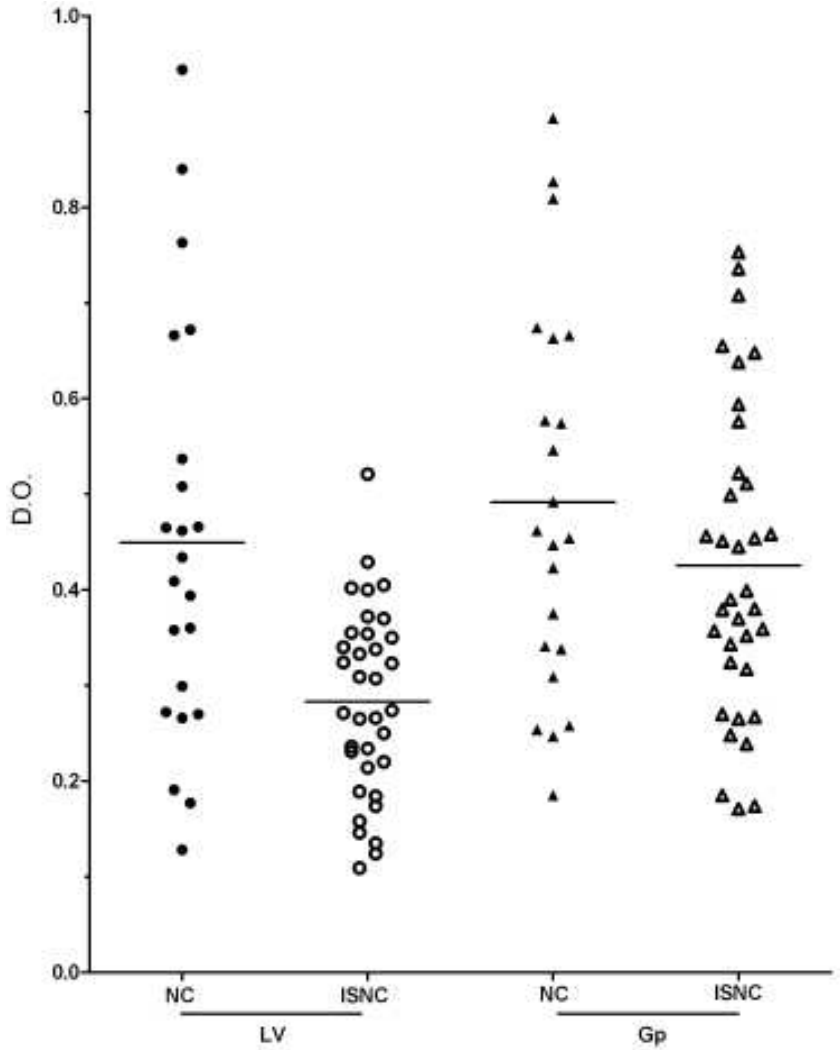

Fig 7. Resultados da pesquisa de anticorpos IgA em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O.= Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,449; Gp = 0,491.

Cinquenta e sete amostras de soro, 22 de pacientes com NC, 18 de pacientes com outras infecções [sífilis (n=5), mononucleose infecciosa (n=3), citomegalovirose (n=3), hepatite A (n=2), toxoplasmose (n=5)] e 17 de pessoas presumivelmente sadias foram utilizadas para a pesquisa de IgM e os resultados da pesquisa de anticorpos para as preparações LV e fração Gp, são apresentados na Figura 8.

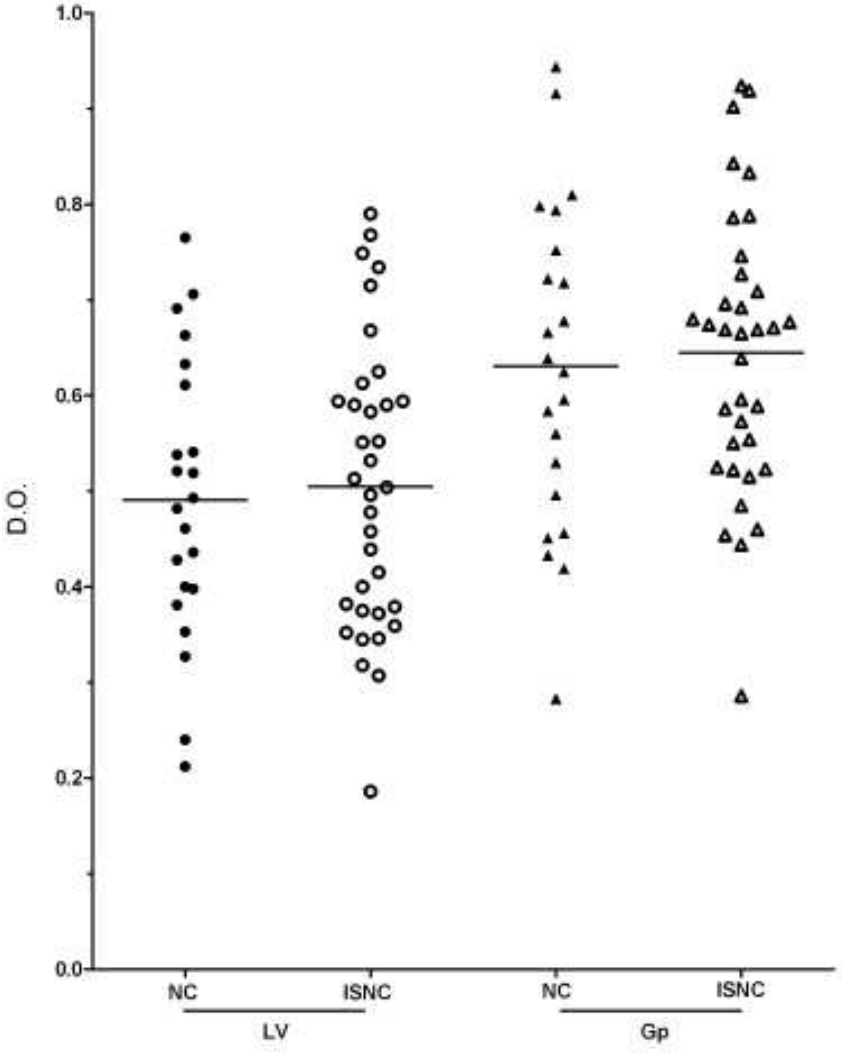

Fig 8. Resultados da pesquisa de anticorpos IgM em amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e pacientes com outras infecções e pessoas presumivelmente sadias (ISNC) com as preparações antigênicas LV e fração Gp. D.O. = Densidade ótica; (—) média. Médias dos pacientes com NC: LV = 0,491; Gp = 0,630.

Nas condições estabelecidas para a pesquisa de anticorpos da classe IgG e suas subclasses, IgE e IgA, não houve detecção de anticorpos IgM específicos com as preparações de LV e fração Gp nas amostras de soros testadas.

Com base nos resultados obtidos, as sensibilidades e especificidades da IgG, IgE e IgA para as preparações antigênicas LV e fração Gp, bem como as medianas de cada reação ELISA, são representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Desempenho das reações ELISA para a IgG, IgE e IgA com as preparações antigênicas LV e fração Gp.

	LV				Fração Gp			
	LCR		soro		LCR		soro	
Anticorpo	S (%) (MD)	E%	S (%) (MD)	E (%)	S (%) (MD)	E (%)	S (%) (MD)	E (%)
IgG	100 (1,173)	100	100 (1,123)	100	90,91 (0,937)	97,06	95,45 (1,031)	100
IgE	93,75 (0,596)	100	90,91 (0,352)	97,14	93,75 (0,557)	100	86,36 (0,311)	100
IgA	NR	NR	54,54 (0,421)	94,28	NR	NR	13,63 (0,458)	100

S=sensibilidade; E=Especificidade; MD=mediana; NR=não realizado.

Em amostras de LCR e de soros, para LV e fração Gp, não foram observadas diferenças significativas entre as sensibilidades das reações ELISA-IgG e ELISA-IgE. As sensibilidades das reações ELISA-IgG e ELISA-IgE foram maiores do que as sensibilidades das reações ELISA-IgA em amostras de soro, com as preparações antigênicas LV e fração Gp. Não foram encontradas diferenças significativas nas especificidades das reações de ELISA-IgG, ELISA-IgE e ELISA-IgA realizadas com LV e fração Gp.

Em amostras de LCR e de soros, tanto com a fração LV como com a fração Gp, as medianas das reações ELISA-IgG foram maiores que as medianas das reações ELISA-IgE. Em amostras de soros, as medianas das reações ELISA-IgG foram maiores que as

medianas das reações ELISA-IgA, tanto com LV como com Gp. Em amostras de soros, a mediana da reação ELISA-IgA foi maior que a mediana da reação ELISA-IgE com a fração Gp, enquanto que com a fração LV não houve diferença significativa.

Com relação à comparação das preparações antigênicas, as análises estatísticas não mostraram diferenças significativas nas sensibilidades das reações ELISA realizadas com LV e fração Gp para a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgE e das subclasses da IgG em amostras de LCR. Em amostras de soros, as reações ELISA-LV apresentaram maior sensibilidade que as reações ELISA-fração Gp para a pesquisa de IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgA, enquanto as sensibilidades das duas reações para a pesquisa de IgG, IgG_4, IgE não mostraram diferenças significativas.

As reações cruzadas detectadas com a pesquisa de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA e das subclasses da IgG são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Reatividade cruzada nas reações ELISA

Anticorpo	LV		Fração Gp	
	LCR	soro	LCR	soro
IgG	ND	ND	neurotoxo a	ND
IgG_1	ND	CMV 1 mono 2	neurotoxo a neurotoxo b neurosífilis a	sífilis 1 CMV 1
IgG_2	ND	sífilis 1	neurotoxo c neurosífilis a	sífilis 1
IgG_3	mening. bact.	sífilis 1	ND	sífilis 2 toxo 1 mono 1 sífilis 1
IgG_4	neurocripto	ND	ND	ND
IgE	ND	mono 2	ND	ND
IgA	ND	sífilis 3 pessoa sadia	ND	ND

Neurotoxo = neurotoxoplasmose; toxo = toxoplasmose; CMV = citomegalovirose; mono = mononucleose infecciosa; mening. bact = meningite bacteriana; neurocripto = neurocriptococose; ND = não detectada.

5. DISCUSSÃO

Existem poucos trabalhos comparativos sobre a pesquisa de diferentes classes e subclasses de anticorpos na NC.

Flisser et al. (1980) pesquisaram por imunoeletroforese, utilizando como preparação antigênica um extrato salino de escólex e parede de cisticercos de *T. solium*, anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgE, IgA e IgD em amostras de soros dos seguintes grupos de pessoas: 87 pacientes nos quais cisticercose cerebral ou visceral não foi detectada em autópsia (grupo 0), 87 voluntários aparentemente normais (grupo 1), 233 pacientes com outras doenças neurológicas (grupo 2), 129 pacientes com diagnóstico clínico mais provável de cisticercose (grupo 3), 54 pacientes com cisticercose confirmada por cirurgia ou autópsia (grupo 4). Os resultados obtidos mostraram que a positividade variou com a probabilidade dos participantes da pesquisa ter cisticercose: grupo 0 = 1,1%, grupo 1 = 2,2%, grupo 2 = 3,8%, grupo 3 = 31% e grupo 4 = 44,4%. Os casos nos quais anticorpos específicos foram detectados mostraram uma resposta muito heterogênea com relação ao número e tipos de antígenos reconhecidos, classificados de acordo com a sua mobilidade eletroforética. O antígeno que apresentou maior positividade, denominado antígeno B, foi reconhecido por 84,5% dos soros apresentando anticorpos anti-cisticercos. Imunofluorescência indireta realizada com imunoglobulinas monoespecíficas nas preparações imunoeletroforéticas, revelaram que anticorpos IgG, IgM, IgE, IgA e IgD foram detectados em, respectivamente, 98%, 80%, 37%, 29% e 24% dos soros positivos. Um componente anódico da preparação antigênica, denominado antígeno H, pareceu favorecer preferencialmente a síntese de IgE.

Correa et al. (1985), procurando verificar se a resposta imune humoral participa da proteção na cisticercose humana, pesquisaram por imunofluorescência indireta, utilizando seções de cisticercos de *T. solium* obtidos de órgãos humanos, a presença de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE e do componente do sistema complemento C3b sobre a

superfície dos parasitas. Dos doze parasitas testados, obtidos de 10 pacientes, IgG, IgM, IgA, IgE e C3b foram encontrados em 11, 8, 10, 3 e 6 parasitas, respectivamente. Nos três casos com presença de anticorpos IgE, a localização dos parasitas era muscular, subcutânea e subretiniana. Para saber se a resposta imune específica correlacionava-se com as imunoglobulinas encontradas nas superfícies dos parasitas, os autores pesquisaram anticorpos específicos totais por imunoeletroforese e anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE por ELISA no soro e nos fluídos próximos ao encontro dos parasitas, como LCR em casos de cisticercose cerebral e humores vítreo e aquoso em um caso de cisticercose intra-ocular. Os autores não encontraram correlação entre a presença de IgG, IgM, IgA, IgE e C3b na superfície dos parasitas e sinais de dano nos cisticercos ou com as classes de anticorpos detectadas por ELISA.

Grogl et al. (1985) pesquisaram por *Imunoblot*, utilizando como preparação antigênica um extrato salino total de cisticercos de *T. solium*, componentes antigênicos identificados por anticorpos presentes em soros de 17 pacientes com NC provenientes de diferentes áreas da Colômbia e 15 soros de indivíduos sadios, 8 norte- americanos e 7 colombianos. O diagnóstico de NC foi baseado em dados clínicos, sorológicos e de tomografia computadorizada. Quando os soros foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata, 51 bandas com pesos moleculares (PM) variando de $1,35x10^4$ a $2,6x10^6$ daltons foram detectadas. Dessas 51 bandas, 37 foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros de pacientes com NC, sendo seis dessas bandas também reconhecidas por anticorpos presentes em soros de pessoas sadias. Anticorpos IgG reconheceram um maior número de bandas (34, com PM variando de 14.000 a 260.000 daltons), seguidos dos anticorpos IgE (15, com PM variando de 29.000 a 115.000 daltons), IgM (7, com PM variando de 41.000 a 77.000 daltons) e IgA (6, com PM variando de 36.000 a 72.000 daltons). Antígenos com pesos moleculares de

30.000-32.000, 35.000-36.000, 41.000, 45.000, 53.000 e 64.000 daltons foram imunodominantes. Todos os pacientes estudados apresentavam anticorpos das classes IgG e IgE contra esses antígenos. Aproximadamente 65% dos componentes antigênicos eram glicoproteínas com cadeias oligossacarídias contendo N-acetil-D-glucosamina e alfa-D-galactose, sugerindo um papel importante da parte glicídica das glicoproteínas na imunogenicidade e antigenicidade dos cisticercos de *T. solium*.

Espinoza et al. (1986) pesquisaram por ELISA, utilizando como preparações antigênicas um extrato bruto de cisticercos de *T. solium* (EB) e uma fração do parasita parcialmente purificada (AgB) anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgA e IgE em 162 amostras de soros e 168 amostras de LCR. As amostras de soros foram obtidas dos seguintes grupos de indivíduos: 61 pacientes com NC (confirmada em cirurgia ou com dados clínicos e laboratoriais sugestivos da doença, incluindo a detecção de anticorpos específicos no soro por imunoeletroforese); 76 pessoas sadias e 25 pacientes com outras doenças parasitárias (5 hidatidose, 5 estrongiloidíase, 5 triquinose, 5 filaríase e 5 larva migrans viceral). As amostras de LCR foram obtidas de 82 pacientes com NC, confirmada por cirurgia ou pela presença de anticorpos específicos no soro, 70 amostras de indivíduos sadios submetidos à anestesia subdural e 16 amostras de pacientes com outras doenças neurológicas. A reação ELISA-EB apresentou para a pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE em amostras de soros sensibilidades de 85%, 50%, 26% e 3%, respectivamente, enquanto as sensibilidades dessa reação para a pesquisa dessas mesmas classes de anticorpos no LCR foram 90%, 20%, 13% e 3%, respectivamente. A reação ELISA-AgB apresentou para a pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE em amostras de soros sensibilidades de 80%, 29%, 0% e 0%, respectivamente, enquanto as sensibilidades dessa reação para a pesquisa dessas mesmas classes de anticorpos no LCR foram 90%, 13%, 10% e 0%, respectivamente. Altos níveis de anticorpos IgE

específicos têm sido descritos em muitas doenças causadas por helmintos (Cooper, 2008). Segundo os autores, anticorpos IgE podem não ter sido detectados em decorrência das altas diluições de soro (1:2.000) e LCR (1:10) utilizadas ou devido à competição com a IgG por determinantes antigênicos, pois a IgG, além de muito mais abundante, possui maior avidez do que a IgE para os determinantes antigênicos.

Short et al. (1990) pesquisaram por uma técnica de radioimunoensaio (RIE) quantitativo, utilizando como preparação antigênica um extrato bruto salino total de cisticercos de *T. solium*, anticorpos específicos da classe IgE e da subclasse IgG_4 em amostras de soros e LCR de 21 pacientes considerados clinicamente infectados (CI) , com base nos sintomas, exame físico e evidências de neuroimagem (raios X, TC e RM) compatíveis com cisticercose, 17 pacientes provavelmente sem a infecção (PSI), com base na falta de evidência típica de cisticercose em resultados de neuroimagem, e amostras de soros de 11 indivíduos selecionados de um grupo de funcionários sadios do laboratório, apresentando baixo risco de exposição à infecção (IS). Anticorpos IgE não foram detectados em nenhuma das amostras de soros e LCR testadas. Não houve diferença significativa entre os três grupos com relação a IgG_4 total no soro. O nível de IgG_4 específica no soro foi significativamente maior no grupo de pacientes CI do que no grupo PSI. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de IgG_4 específica nos grupos PSI e IS. O grupo CI apresentou nas amostras de LCR níveis de IgG_4 total de 18,6 µg/ml e específica de 86 unidades arbitrárias (UA)/ml, significativamente maiores do que aqueles apresentados pelo grupo PSI, respectivamente, 2,5 µg/ml e 1,6 UA/ml.

Yang et al. (1998) pesquisaram por *Imunoblot*, utilizando como preparação antigênica líquido vesicular de cisticercos de *T. solium*, anticorpos específicos em 247 soros de pacientes com NC, 105 soros de pacientes com outras infecções e 20 soros de

pessoas presumivelmente sadias. Os pacientes com NC foram diagnosticados por achados de neuroimagem (CT ou RM) compatíveis e reações de ELISA positivas no sangue e/ou LCR. A banda mais reconhecida pelos pacientes com NC foi um componente do líquido vesicular com peso molecular de 10 kDa, com reações positivas encontradas em 209 (84,7%) dos 247 soros testados. Com relação aos soros de pacientes com outras parasitoses e soros de pessoas sadias, reações positivas para o componente 10 kDa foram encontradas em 4 pacientes com equinococose. Utilizando soros de cinco pacientes com NC, os autores mostraram que os anticorpos IgG_1 e principalmente IgG_4 foram predominantes. Em reações de ELISA, utilizando soros de 80 pacientes com NC e líquido vesicular de cisticercos como preparação antigênica, a maior absorbância média das reações foi obtida com a subclasse IgG_4, seguida da IgG_1.

Bueno et al. (2000) pesquisaram por ELISA, utilizando como preparações antigênicas líquido vesicular de *T. crassiceps* (Tcra) e extrato salino total de cisticercos de *T. solium* (Tso), anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgA e IgE em amostras pareadas de soro, LCR e saliva de 25 pacientes com NC (grupo I) , amostras de LCR de 10 pacientes com outras doenças neurológicas, 35 amostras de soros e 7 amostras de saliva de pessoas presumivelmente sadias (grupo II) e 23 amostras de soros de pacientes com testes sorológicos reativos para outras parasitoses - toxocaríase, toxoplasmose, doença de Chagas e esquistossomose (grupo III). Dos 25 pacientes com NC, 15 (60%) apresentavam a forma ativa da doença e 10 (40%) a forma inativa, caracterizadas, respectivamente, por neuroimagens (TC e/ou RM) apresentando ou não características de processo inflamatório. Considerando os 25 pacientes com NC, a reação ELISA IgG-Tcra apresentou sensibilidade de 100% para soro e LCR e 32% para saliva, enquanto a reação ELISA IgG-Tso apresentou sensibilidade de 80% para soro, 100% para LCR e 24% para saliva. A especificidade das duas reações foi de 80% para soro e 100% para

LCR, enquanto as reações ELISA IgG-Tcra e ELISA IgG-Tso apresentaram para saliva especificidades de 100% e 87,5%, respectivamente. A reação ELISA IgA-Tcra apresentou, respectivamente, sensibilidade e especificidade de 36% e 97,1% para soro, 40% e 100% para LCR e 4% e 90% para saliva. A reação ELISA IgE-Tcra apresentou 24% de sensibilidade e 97,1% de especificidade para soro. Anticorpos IgE não foram detectados com esta técnica em amostras de LCR e saliva. De um modo geral, a pesquisa de anticorpos revelou a presença de concentrações de IgG > IgA > IgE no soro, LCR e saliva, com presença de IgG em todas as fases evolutivas da doença, enquanto que a IgA e a IgE foram mais freqüentes na forma inativa. A reação ELISA IgA-Tcra apresentou positividade em 33% dos pacientes com a forma ativa e em 40% com a forma inativa, enquanto a reação ELISA IgE-Tcra foi positiva em 20% e 30% dos casos, respectivamente.

Huang et al. (2002), utilizando papel de nitrocelulose como suporte, anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgG_4 humana marcados com partículas de ouro como sonda e fluído vesicular de cisticercos de *T. solium* como antígeno, pesquisaram anticorpos IgG_4 em 49 soros de pacientes com NC, 99 soros de pacientes com outras doenças parasitárias, 28 soros de pacientes com outras doenças cerebrais e 45 soros de pessoas sadias. O diagnóstico de NC foi baseado em manifestações clínicas, resultados de TC e RM, testes imunológicos e/ou exame anátomo-patológico. Anticorpos IgG_4 foram detectados em 48 (97,8%) dos 49 dos pacientes com NC. Todas as amostras de pacientes com outras doenças e controles sadios foram negativas, com exceção de três pacientes com equinococose que apresentaram uma fraca reação cruzada.

Odashima et al. (2002) pesquisaram por ELISA, utilizando como preparação antigênica um extrato bruto salino total de cisticercos de *T. solium*, anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgA e IgE em amostras de LCR , correlacionando os achados com

as características clínicas e achados tomográficos dos pacientes. Foram analisadas 85 amostras de LCR, 43 de pacientes com NC, 26 com NC ativa e 17 com a forma inativa, classificadas segundo Sotelo et al. (1985), e 42 de um grupo de pacientes sem NC, definido pela ausência de anormalidades sugestivas de NC em exames de neuroimagem. A forma inativa da NC apresentou perfil imunológico no LCR semelhante ao grupo sem a infecção. Por outro lado, a forma ativa da NC apresentou altos níveis de imunoglobulinas especificas, com a maior positividade para IgG, seguida, em ordem decrescente, pela positividade para IgM, IgE e IgA. As sensibilidades da reação de ELISA para a detecção de anticorpos das classes IgG, IgM, IgE e IgA foram, respectivamente, 88,5%, 65,4%, 31,8% e 26,9%. Níveis maiores de anticorpos foram observados em casos com lesões intraventriculares com sinais de inflamação no LCR e naqueles pacientes com múltiplas manifestações clínicas.

Chavarria et al. (2005) pesquisaram por meio de ELISA, utilizando LV de cisticercos de *T. solium* como antígeno, anticorpos específicos da classe IgE e das subclasses da IgG em amostras de LCR de 45 pacientes com NC sintomática. Pacientes com doença severa (hipertensão intracranial, definida pela presença de dor de cabeça, náusea, vômito e papiledema) mostraram níveis maiores de IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgE em comparação com os casos moderados (déficits focais e/ou convulsões).

Chavarria et al. (2006) pesquisaram por meio de ELISA, utilizando LV de cisticercos de *T. solium* como antígeno, anticorpos específicos da classe IgE e das subclasses da IgG em 52 amostras de soros de pacientes com NC, 26 casos sintomáticos e 26 casos assintomáticos. Os casos assintomáticos, com exames de neuroimagem mostrando um único cisticerco calcificado no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóide, apresentaram baixos níveis de todas as subclasses da IgG. Os casos sintomáticos, com exames de neuroimagem mostrando um ou múltiplos cisticercos nos

estágios vesicular, coloidal, calcificado ou misto localizados no espaço subaracnóide da base e/ou no sulco, nas cavidades ventriculares, no parênquima ou em mais de uma dessas localizações, apresentaram níveis aumentados de todas as subclasses da IgG.

Intapan et al. (2008) avaliaram por ELISA a produção de anticorpos IgG_4 em 14 soros de pacientes com NC, 20 soros de pessoas aparentemente sadias, 9 soros de pacientes com infecção por *Taenia saginata* e 35 soros de outras parasitoses, utilizando como preparações antigênicas um extrato bruto total salino de cisticercos de *T. solium* e dois peptídeos sintéticos, HP6-3 e Ts45W-1, derivados do seqüenciamento de antígenos de *T. saginata* e *Taenia ovis*. A reação ELISA-IgG_4 apresentou os melhores resultados com o extrato bruto total, 100% de sensibilidade e 80,9% de especificidade.

Quatro dos trabalhos anteriormente citados avaliam a produção simultânea de várias classes de anticorpos em pacientes com NC. Em três desses trabalhos, um realizado com imunoeletroforese e amostras de soros (Flisser et al.,1980), um com *Imunoblot* e amostras de soros (Grogl et al.,1985) e um com ELISA e amostras de LCR e soros (Espinoza et al., 1986), utilizando como preparação antigênica um extrato bruto total de cisticercos de *T. solium*, os autores obtiveram maior positividade para IgG seguida em ordem decrescente pela positividade para IgM, IgA e IgE. Odashima et al. (2002), utilizando ELISA com um extrato bruto total de cisticercos de *T. solium*, obtiveram em amostras de LCR, maior positividade para IgG seguida em ordem decrescente pela positividade para IgM, IgE e IgA. Bueno et al. (2000), utilizando ELISA e preparações antigênicas de cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps*, obtiveram em soro maior positividade para IgG seguida em ordem decrescente pela positividade para IgA e IgE e em LCR maior positividade para IgG seguida da IgA, sem detecção de IgE.

Com relação às classes de imunoglobulinas, a maior discordância de nossos dados com aqueles encontrados na literatura diz respeito à pesquisa de IgM. Em nosso

estudo, anticorpos IgM não foram observados nas amostras de soros e LCR de pacientes com NC, enquanto que nos três trabalhos encontrados na literatura onde a IgM foi pesquisada, essa classe de anticorpos foi detectada em 13% a 80% das amostras estudadas (Flisser et al., 1980; Espinoza et al., 1986; Odashima et al., 2002).

Anticorpos IgM são parte da resposta primária de anticorpos, sendo detectados com muito menos freqüência em infecções crônicas e na resposta secundária de anticorpos. Teoricamente, não seria esperada a detecção desses anticorpos em um número significativo de pacientes com NC, devido ao longo tempo de evolução da doença na maioria dos pacientes estudados. Utilizamos em nosso estudo para a determinação dos *cut-offs* das reações o índice J, determinado com as amostras biológicas obtidas de pacientes com NC e com outras infecções e de pessoas sadias. Utilizando esse critério, não detectamos anticorpos IgM em nenhuma das amostras de soro e LCR incluídas em nosso estudo. Quando o índice J para a IgM é calculado levando em consideração somente as amostras de soros de pacientes com NC e as amostras de soros de pessoas sadias, as sensibilidades e especificidades das reações de ELISA IgM, utilizando LV ou fração Gp como preparação antigênica, foram, respectivamente, 27,27% e 100%, mostrando a influência da seleção das amostras biológicas incluídas no estudo e do cálculo do *cut-off* nos resultados obtidos. Cabe ressaltar que, diferentemente da pesquisa de IgA e IgE, os soros não foram pré-absorvidos com *RF Absorbent* para a pesquisa de IgM, podendo resultados falso-negativos ter sido originados, devido a competição da IgG com a IgM por determinantes antigênicos.

Anticorpos IgA na NC tem sido detectados em amostras de soros, LCR, saliva e lágrimas (Flisser et al., 1980; Espinoza et al., 1986; Bueno et al., 2000; Odashima et al., 2002; Sahu et al., 2008). Em amostras de soros, anticorpos IgA têm sido detectados em 13% a 36% dos pacientes com NC (Flisser et al., 1980; Espinoza et al., 1986; Bueno et

al., 2000). No nosso estudo, com as preparações LV e fração Gp, esses anticorpos foram detectados em, respectivamente, 54,54% e 13,63% das amostras de soros. Enquanto o papel da IgA secretora é bem estabelecido na imunologia das mucosas, não se conhece muito sobre a função da IgA sérica (Monteiro & Winkel, 2003). Não encontramos na literatura comentários sobre o motivo da produção da IgA na NC, bem como a sua função. Reações de *Imunoblot* realizadas com antígenos excretório-secretórios de *T. solium* mostraram que anticorpos IgG_1 e IgA são detectados com alta freqüência em amostras de soros pacientes com teníase (Wilkins et al., 1999). Como no ciclo biológico do parasita os vermes adultos se instalam no intestino humano, anticorpos séricos da classe IgA poderiam ser produzidos para esses antígenos. Determinantes antigênicos comuns ou similares entre o verme adulto e a forma larval poderiam induzir a produção de anticorpos da classe IgA pelos cisticercos na NC.

Com relação à pesquisa simultânea das subclasses da IgG e da IgE, os dados da literatura também são escassos, com um trabalho mostrando por radioimunoensaio que anticorpos IgE não foram detectados em amostras de LCR e soros e que os níveis de IgG_4 foram significantemente maiores em pacientes com NC sintomáticos do que no grupo de pacientes sem a infecção (Short et al., 1990), um trabalho mostrando que em pacientes com doença severa apresentando hipertensão intracraniana os níveis de IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgE em LCR foram maiores que em casos de infecção moderada (Chavarria et al., 2005) e um trabalho mostrando que soros de pacientes com NC sintomática apresentavam níveis aumentados de todas as subclasses da IgG. Com relação à pesquisa de IgG_4 isolada, Huang et al. (2002) e Intapan et al. (2008) detectaram essa subclasse de anticorpo em, respectivamente, 97,80% e 100% das amostras de soros de pacientes com NC testadas.

A produção de IgG_4 e IgE é controlada por vários mecanismos, embora as citocinas IL-4/IL-13 tenham grande importância na diferenciação de linfócitos em plasmócitos produtores dessas duas imunoglobulinas, consideradas parte da resposta Th2. Um dos efeitos dessa dependência comum de células Th2 é que antígenos que induzem respostas de IgE são também bons indutores de respostas IgG_4 (Aalberse et al., 2009).

Em infecções por helmintos, vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram uma elevação da produção de anticorpos IgG_4 e IgE (Garaud et al., 2003). A IgG_4 é geralmente considerada um anticorpo não patogênico, pela sua ineficiência tanto na ativação do sistema complemento como na formação de imunocomplexos grandes (devido a sua monovalência efetiva), os quais poderiam causar graves problemas em estimulação antigênica crônica. Usualmente, são necessários muitos meses de repetida exposição antigênica antes que a resposta IgG_4 torne-se proeminente (Aalberse et al., 2009). A IgG_4 está associada com condições clínicas severas, como pode acontecer na NC. Algumas dessas associações sugerem um efeito protetor, como em imunoterapia específica a alérgenos e proteção de efeitos alérgicos durante as parasitoses (Aalberse et al., 2009). Em um estudo recente em malária causada por *Plasmodium falciparum*, em indivíduos naturalmente expostos em áreas endêmicas, foram observados altos níveis de IgG_1, IgG_2 e IgG_3 em indivíduos assintomáticos e com malária sem complicações, enquanto que nos indivíduos com complicações causadas pela infecção, foram encontrados altos níveis de IgG_4, IgE e IgM, sugerindo que alguns anticorpos podem ter função protetora, enquanto outros podem ser patogênicos (Leoratti et al., 2008). Num estudo de esquistossomose em indivíduos sintomáticos apresentando a doença em diversos estágios, níveis elevados de IgG_4 contra antígenos de ovos do parasita foram encontrados em pacientes com fibrose incipiente, em comparação a indivíduos não infectados ou com hepatoesplenomegalia,

indicando uma correlação positiva entre os níveis de IgG_4 e intensidade da infecção (Caldas et al., 2008).

No nosso trabalho, os anticorpos IgG_4 e IgE foram detectados com elevada freqüência. Os anticorpos IgG_4 foram detectados em, respectivamente, 90,91% e 100% das amostras de LCR e soros com ELISA utilizando LV e em, respectivamente, 86,36% e 90,91% das amostras de LCR e soros com ELISA utilizando a fração Gp. Os anticorpos IgE foram detectados em, respectivamente, 93,75% e 90,91% das amostras de LCR e soros com ELISA utilizando LV e em, respectivamente, 93,75% e 86,36% das amostras de LCR e soros com ELISA utilizando a fração Gp. Em três pacientes foram detectados anticorpos da classe IgE e das quatro subclasses da IgG, em amostras de LCR e soro, tanto para LV como para fração Gp. Dois pacientes, um apresentando crises epilépticas e o outro com hipertensão intracraniana e hidrocefalia, apresentavam cisticercos em vários estágios evolutivos. Um paciente com crises epilépticas apresentava lesões calcificadas e um cisto racemoso.

Preparações antigênicas compostas de frações glicoprotéicas têm sido utilizadas com sucesso em reações de *Imunoblot* para a pesquisa de anticorpos anti-cisticercos, sendo a técnica desenvolvida por Tsang et al. (1989), utilizando glicoproteínas com afinidade por lentil-lectina como preparação antigênica, considerada o padrão ouro na sorologia para NC. Em nosso estudo, as reações de ELISA realizadas com LV mostraram sensibilidades iguais ou superiores àquelas obtidas com a fração Gp, composta de glicoproteínas com afinidade por lentil-lectina. Essa diferença de comportamento pode ser explicada em parte pelas interações diferentes que ocorrem entre as glicoproteínas e as matrizes de poliestireno e nitrocelulose, utilizadas nas reações de ELISA e *Imunoblot*, respectivamente. Devido a complexidade da obtenção da fração Gp e o seu custo final, o LV parece adequado para a pesquisa de anticorpos por ELISA na NC, considerando os

resultados do presente estudo e de estudos de avaliação de preparações antigênicas encontrados na literatura (Larralde et al., 1990; Bueno et al., 2000; Bueno et al., 2001; Arruda et al., 2005, Suzuki et al., 2007).

Uma das grandes dificuldades no imunodiagnóstico da NC tem sido a reatividade cruzada entre antígenos de cisiticercos e anticorpos de pacientes com outras infecções. No presente trabalho, o maior número de reações cruzadas foi encontrado em pacientes com sorologia positiva para toxoplasmose. Reações falso-positivas para NC com soros de pacientes com toxoplasmose também foram observadas em outros estudos (Suzuki et al., 2007).

A grande variação de resultados com relação à pesquisa de anticorpos na NC está relacionada a vários fatores, salientando-se heterogeneidade dos pacientes incluídos no estudo, o estado imune dos pacientes na época de coleta das amostras de sangue e/ou LCR, o número, localização e estágio evolutivo dos parasitas no SNC, as propriedades intrínsecas das técnicas utilizadas para pesquisa de anticorpos, a preparação antigênica e o método utilizado para determinar o *cut-off* das reações. Os pacientes com NC incluídos no presente estudo, além de dados epidemiológicos e de neuroimagem compatíveis com a infecção, apresentavam produção intratecal de anticorpos IgG anti-cisticercos, parâmetro altamente confiável para o diagnóstico das neuroinfecções.

Analisando anticorpos específicos das classes IgG, IgE, IgA e IgM e das subclasses da IgG, tanto em amostras de LCR como em amostras de soros, com duas preparações antigênicas (LV e fração Gp), o presente trabalho contribui tanto para o diagnóstico como para o entendimento da fisiopatologia da NC, bem como abre perspectivas para pesquisas futuras, como o fracionamento do LV, com o intuito de identificar frações com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada.

6. CONCLUSÕES

Com relação à pesquisa de anticorpos específicos anti-cisticercos em amostras de LCR e soro de pacientes com NC, por ELISA, utilizando como preparações antigênicas o LV e a fração Gp, podemos concluir:

1. Em pacientes com NC sintomática, com as preparações antigênicas LV e fração Gp, tanto em amostras de LCR como em amostras de soros, a maior positividade em reações ELISA foi obtida na detecção de anticorpos das classes IgG e IgE, seguida da positividade da IgA. Anticorpos IgM não foram detectados em amostras de soros com reações de ELISA realizadas com as duas preparações antigênicas.

2. A IgG_4, em reações ELISA realizadas com LV e fração Gp, tanto em amostras de LCR como em amostras de soros, apresentou positividade e valores de concentração iguais ou superiores às outras subclasses da IgG.

3. As reações ELISA realizadas com LV mostraram sensibilidades iguais ou superiores àquelas obtidas com a fração Gp. Considerando a complexidade da obtenção da fração Gp e o seu custo final, o LV parece adequado para a pesquisa de anticorpos por ELISA na NC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aalberse RC, Stapel SO, Schuueman, Rispens T. Immunoglobulin G_4: an odd antibody. Clin Exp Allergy. 2009; 39: 469-77.

Agapejev S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996, 38: 207-16.

Agapejev S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. Arq Neuropsiquiatr. 2003; 61: 822-8.

Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiatr. 1994; 57: 897-902.

Arambulo III PV, Walls KW, Bullock S, Kagan IG. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). Acta Tropica. 1978, 35: 63-7.

Arruda GC, Silva ADT, Quagliato EAMB, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Trop Med Int Health. 2005; 10: 1005-12.

Arruda GC, Quagliato EAMB, Rossi CL. Intrathecal synthesis of specific immunoglobulin G antibodies in neurocysticercosis: evaluation of antibody concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using a whole cysticercal extract and cyst vesicular fluid as antigen. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 54: 45-9.

Bisser S, Lejon V, Preux PM, Bouteille B, Stanghellini A, Jauberteau MO et al. Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. J Neurol Sci. 2002; 193: 127-35.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA. Detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. Arq Neuropsiquiatr. 2000; 58: 18-24.

Bueno EC, Snege M, Vaz AJ, Leser PG. Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. Clin Diag Lab Immunol. 2001; 8: 1140-4.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira MAS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune response during acute and chronic phases of the infection. Acta Tropica. 2008; 108: 109-17.

Canelas HM. Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. Arq Neuropsiquiatr. 1962; 20: 1-16.

Carpio A, Escobar A, Hauser, WA. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. Epilepsia. 1998; 39: 1025-40.

Carpio A. Neurocysticercosis: an update. Lancet Infect Dis. 2002; 2: 751-62.

Chang KH, Kim WS, Cho SY, Han MC, Kim CW. Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. Am J Neuroradiol. 1988; 9: 125-30.

Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. Clin Immunol.2005; 271-8.

Chavarria A, Fleury A, Bobes RJ, Morales J, Fragoso G, Sciutto E. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. Microbes and Infection. 2006; 8: 1082-89.

Conover WJ. Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons Inc, Nova Iorque, 1971.

Cooper PJ, Ayre G, Matin C, Rizzo JA, Ponte EV, Cruz AA. Geohelminth infections: a review of the role of IgE and assessment of potential risks of anti-IgE treatment. Allergy 2008; 63: 409-17.

Corona T, Pascoe D, Gonzaléz-Barranco D, Abad P, Landa L, Estañol B. Anticysticercus antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1986; 49: 1044-9.

Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela T, Madrazo I et al. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J Parasitol. 1985; 71: 535-41.

Del Brutto OH, Sotelo J. Neurocysticercosis: an update. Rev Infect Dis. 1988; 10: 1075-87.

Del Brutto OH, Rajshekhar V, White Jr AC, Tsang VCW, Nash TE, Takayanagui OM et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. Neurology. 2001; 57: 177-83.

Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J Clin Microbiol. 1986: 24: 536-41.

Estañol B, Juárez H, Irigoyen MC, Gonzáles-Barranco D, Corona T. Humoral imune response in patients with cerebral cysticercosis treated with praziquantel. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1989; 52: 254-7.

Fleiss JL.Statistical Methods for Rates and Proportions. New York, NY; John Whiley and Sons Inc., 1981.

Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin Exp Immunol.1980; 39: 27-37.

Foster WD. The cestodes. In: A history of parasitology. E. & S. Livingstone LTDA, Edinburgh, London, 1965: 29-51.

Garaud O, Perraut R, Riveau G, Nutman BT. Class and subclasses selection in parasite-specific antibody responses. Trends Parasitol. 2003; 19: 300-4.

Garcia E, Ordoñez G, Sotelo J. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. J Clin Microbiol. 1995; 33: 3324-5.

García HH, Evans CA, Nash TE, Takayanagui OM, White AC Jr, Botero D et al. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 747-56.

Garcia HH, Gonzalez AE, Tsang VCW, Gilman RH. Neurocysticercosis: some of the essentials. Practical Neurology. 2006; 6: 288-97.

Garg RK. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. Neurology. 2002; 58: 1315.

Gounni AS, Lambkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet JP, Capron A et al. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? J Allergy Clin Immunol. 1994; 94: 1214-6.

Grogl M, Estrada JJ, McDonald G, Kuhn RE. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. J Parasitol 1985; 71: 433-42.

Halperin JJ, Logigian EL, Finkel MF, Pearl RA. Practice parameters for the diagnosis of patients with nervous system Lyme borreliosis (Lyme disease). Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 1996; 46: 619-27.

Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin Chem. 1987; 33(10): 1707-25.

Hancock K, Tsang VCW. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. J Immunol Methods. 1986; 92: 167-76.

Huang B, Li G, Jia F, Liu F, Gel L, Li W et al. Determination of specific IgG_4 for diagnosis and therapeutic evaluation of cerebral cysticercosis. Chin Med J 2002; 115: 580-3.

Intapan PM, Khotsri P, Kanpittaya J, Chotmongkol V, Maleewong W, Morakote N. Evaluation of IgG_4 and total IgG antibodies against cysticerci and peptide antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis by ELISA. Asian Pac J Allergy Immunol. 2008; 26: 237-44.

Ito A, Placarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY et al. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59: 291-4.

Kaiser R, Rauer S. Analysis of the intrathecal immune response in neuroborreliosis to a sonicate antigen and three recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998; 17: 159-66.

Kraft R. Cysticercosis: an emerging parasitc disease. American Family Physician. 2007; 76:92-6.

Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Arch Pathol Lab Med. 1990; 114: 926-8.

Lejon V, Reiber H, Legros D, Djé N, Magnus E, Wouters I et al. Intrathecal immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system involvement in trypanosomiasis. J Infect Dis. 2003; 187: 1475-83.

Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC et al. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. Malaria J. 2008; 24: 186-96.

Machado ABB, Pialarissi CSM, Vaz AJ. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). Rev Saúde Públ. 1988; 22: 240-4.

Machado LR, Livramento JA, Vaz AJ, Bueno EC, Mielli SR, Bastouly V et al. IgG intrathecal synthesis and specific antibody index in patients with neurocysticercosis. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60: 395-9.

Maddison SE. The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 7: 93-105.

Miller BL, Staugaitis SM, Tourtellotte WW, Shapshak P, Goldberg M, Heiner D et al. Intra-blood-brain barrier IgG synthesis in cerebral cysticercosis. Arch Neurol. 1985; 42: 782-4.

Monteiro RC, van der Winkel JGJ. IgA Fc receptors. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 177-204.

Negrão-Corrêa D, Silveira MR, Borges CM, Souza DG, Teixeira MM. Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongiloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation. Infect Immun. 2003; 71: 2607-14.

Nieto D. Historical notes on cysticercosis. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F eds. Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. New York Academic Press, 1982.

Noujaim SE, Rossi MD, Rao SK, CacciarelII AA, Mendonça RA, Wang AM et al. CT and MR imaging of neurocysticercosis. Am J Roentgenol. 1999; 173: 1485-90.

Odashima NS, Takayanagui OM, Figueiredo JFC. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60: 400-5.

Palacios E, Lujambio PS, Jasso RR. Computed tomography and magnetic resonance imaging of neurocysticercosis: a review. Semin Roentgenol. 1997; 32: 325-34.

Peralta RHS, Vaz AJ, Pardini A, Macedo HW, Machado LR, De Simone SG et al. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Acta Tropica. 2002; 83: 159-68.

Pialarissi CSM, Vaz AJ, Souza AMC, Nakamura PM, Camargo ED, Silva MV et al. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico da neurocisticercose. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1987; 29: 367-73.

Potasman I, Resnick L, Luft BJ, Remington JS. Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Ann Int Med. 1988; 108: 49-51.

Preud'homme JL, Petit I, Barra A, Morel F, Lecron JC, Lelièvre E. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. Mol Immunol. 2000; 37: 871-87.

Rajan B, Ramalingam T, Rajan TV. Critical role for IgM in host protection in experimental filarial infection. J Immunol. 2005; 175: 1827-33.

Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis. 1998; 4: 111-7.

Reiber H, Peter, JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J. Neurol. Sciences. 2001; 184: 101-22.

Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. Clin Chem. 1991; 37: 1153-60.

Sahu OS, Parija SC, Sahu PK. Tear IgA-ELISA: a novel and sensitive method for diagnosis of ophthalmic cysticercosis. Acta Tropica. 2008; 106 (3): 168-74.

Schantz MP, Cruz M, Sarti E, Pawloswski Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. Bull Pan Am Health Organ. 1993; 27: 397-403.

Sciutto E, Fragoso C, Fleury A. *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. Microbes and Infection. 2000; 2: 1875-90.

Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. Parasite Immunol. 2007; 29: 621-36.

Short JA, Heiner DC, Hsio RL, Andersen FL. Immunoglobulin E and G_4 antibodies in cysticercosis. J Clin Microbiol 1990; 1635-9.

Silva ADT, Quagliato EMAB, Rossi CL. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 37: 87-92.

Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffete S. The intrathecal humoral immune response: laboratory and clinical relevance. Clin Chem Lab Med. 2001; 39: 333-40.

Sotelo J, Del Brutto, OH. Brain cysticercosis: a review. Arch Med Res. 2000; 31:3-14.

Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. Arch Intern Med. 1985; 145: 442-5.

Sorvillo FJ, DeGiorgio C, Waterman SH. Deaths from cysticercosis, United States. Emerging Infect Dis. 2007, 13: 230-5.

Spina-França, A. Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. Rev Paul Med. 1956; 48: 59-70.

Spina-França A, Livramento JA, Machado LR. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1962). Arq Neuropsiquiatr. 1993; 51: 16-20.

Suzuki LA, Arruda GC, Quagliato EMAB, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 152-5.

Takayanagui OM, Jardim E. Aspectos clínicos da neurocisticercose. Análise de 500 casos. Arq Neuropsiquiatr.1983; 41: 50-63.

Takayanagui OM, Leite JP. Neurocisticercose. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34: 283-90.

Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989; 159: 50-9.

Tumani H., Nölker G, Reiber H. Relevance of cerebrospinal fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis. Neurology. 1995; 45: 1663-70.

Vaz AJ, Machado ABB, Nunes CM, Silva MV, Piazza RMF. Utilização de líquido vesicular de *Cysticercus longicollis* no teste ELISA para o imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24: 176-81.

Vaz AJ, Nakamura PM, Camargo ME, Camargo ED, Ferreira AW. Dot-ELISA for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996; 38: 291-6.

Wallin MT, Kurtzke JF. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. Neurology. 2004; 63: 1559-64.

White AC Jr. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. Annu Rev Med. 2000; 51: 187-206.

Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, Garcia HH et al. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60: 199-204.

Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB et al. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. J Infect Dis. 1991; 164: 1007-9.

Yang HJ, Chung JY, Yun DH, Kong Y, Ito A, Ma L et al. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. Parasite Immunol. 1998; 20: 483-8.

Youden, WJ. Index for rating diagnostic tests. Cancer. 1950; 3: 32-5.

Zini D, Farrell VJR, Wadee AA. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1990; 53: 656-61.