



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS  
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

**MARCO VÍTOR SILVA DE MELO COSTA**

---

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DA NICLOSAMIDA NO  
METABOLISMO DE CISTICERCOS DE TAENIA CRASSICEPS**

**Goiânia**

**2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Marco Vítor Silva de Melo Costa		
E-mail:	marcovitor_@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Universidade Federal de Goiás		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	ANÁLISE BIOQUÍMICA DA NICLOSAMIDA NO METABOLISMO DE CISTICERCOS DE <i>TAENIA CRASSICEPS</i>		
Palavras-chave:	Ácidos orgânicos; Taenia crassiceps; Metabolismo; Niclosamida		
Título em outra língua:	BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE NICLOSAMIDA IN METABOLISM OF <i>TAENIA CRASSICEPS</i> CYSTICERCI		
Palavras-chave em outra língua:	oganic acids, Taenia crassiceps, metabolism, niclosamide		
Área de concentração:			
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	09/ 03 /2015		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-hospedeiro		
Orientador (a):	Dr <sup>a</sup> Marina Clare Vinaud		
E-mail:			
Co-orientador (a):*	Dr <sup>a</sup> Tatiana Luiza da Costa		
E-mail:			

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**MARCO VÍTOR SILVA DE MELO COSTA**

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DA NICLOSAMIDA NO  
METABOLISMO DE CISTICERCOS DE *TAENIA CRASSICEPS***

Dissertação de Mestrado  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia das Relações  
Parasito-Hospedeiro da Universidade  
Federal de Goiás para obtenção do  
Título de Mestre

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Marina Clare  
Vinaud  
Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Tatiane Luiza da  
Costa

**Goiânia  
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Costa, Marco Vítor Silva de Melo

Análise bioquímica da niclosamida no metabolismo de cisticerco de  
*Taenia crassiceps* [manuscrito] / Marco Vítor Silva de Melo Costa. -  
2015.

XVII, 46 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marina Clare Vinaud; co-orientadora Dra.  
Tatiane Luiza da Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós  
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.  
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de  
tabelas.

1. Ácidos orgânicos. 2. *Taenia crassiceps*. 3. Metabolismo. 4.  
Niclosamida. I. Vinaud, Marina Clare, orient. II. Costa, Tatiane Luiza  
da, co-orient. III. Título.

I

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-  
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a): Marco Vítor Silva de Melo Costa**

---

**Orientador (a): Dr<sup>a</sup> Marina Clare Vinaud**

---

**Co-orientador (a): Dr<sup>a</sup> Tatiana Luiza da Costa**

---

**Membros:**

- 1. Dr.<sup>a</sup> Marina Clare Vinaud**
- 2. Dr.<sup>a</sup> Luciana Damacena Silva**
- 3. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra**

**Data: 09/03/2015**



## **DEDICATÓRIA**

***Em especial à minha esposa, Denise Borella de S. Costa, e aos meus pais, Marco Antônio de M. Costa e Sinalva S. de M. Costa.***

## **AGRADECIMENTOS**

---

Quando se pensa na trajetória percorrida até aqui é inevitável não pensar com apreço e gratidão pelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente pela conclusão de mais essa etapa em minha vida.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos aos meus pais, Marco Antônio de Melo Costa e Sinalva Silva de Melo Costa, por terem possibilitado a escolha no caminho do conhecimento. Eu não canso de dizer-lhes que foi o maior bem que poderiam me oferecer. E a minha irmã, Luara Silva de Melo Costa, por também ter auxiliado em muitos momentos fornecendo a privacidade de sua casa e seus dotes culinários.

À minha esposa, Denise Borella de Sousa Costa, por ter me apoiado, compreendido e me fornecido todo equilíbrio emocional e intelectual para a conclusão desse projeto. Enfim, a ela cabe o lugar de companheira da minha vida.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Marina Clare Vinaud, por ter me dado o voto de confiança em me orientar, mesmo não conhecendo minha vida acadêmica, como me comportaria na relação orientador-orientado e em relação ao grupo de trabalho. Além disso, me ensinou a portar-se com paciência e serenidade às frustrações transcorridas no desenvolvimento do mestrado. A ela o meu sincero agradecimento.

Ao pessoal do meu trabalho no Biotério, em especial a Iraci, Gildenice e o Raimundo por sempre está disponível em me substituir para que cumprisse as minhas obrigações acadêmicas, e a Vânia pelas conversas e discussões sobre a execução do projeto.

A toda equipe do LAERPH por serem bem receptivos e disponíveis para auxiliar e apoiar com as tarefas a serem realizadas no laboratório e as análises informais sobre o desenvolvimento do mestrado. Em particular a Dr<sup>a</sup> Carolina Fraga por me auxiliar na prática e obtenção dos dados no HPLC. E aos Professores Dr. José Clecildo Barreto Bezerra e a Dr.<sup>a</sup> Ana Maria de Castro pelos conselhos e experiências passadas de forma admirável.

Assim, peço desculpas aos nomes não citados nessa humilde declaração de reconhecimento pela ajuda e presteza a mim disponibilizadas, pois por motivos óbvios não me vem à cabeça todos os nomes e nem todas as contribuições dadas a mim, mas saibam que os meus sentimentos são de pura gratidão a todas essas pessoas.

## SUMÁRIO

1. TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	XI
1.1. Lista de Figuras .....	XI
1.2. Lista de Tabelas.....	XI
1.3. Lista de Anexos.....	XII
2. SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XIII
3. RESUMO.....	XV
4. ABSTRACT.....	XVII
5. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA .....	1
5.1. Características de <i>Taenia</i> .....	1
5.2. Característica de <i>Taenia crassiceps</i> .....	4
5.3. Niclosamida (5-chloro-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide) 10	
5.4. Metabolismo.....	13
6. JUSTIFICATIVA .....	18
7. OBJETIVOS.....	20
7.1. Objetivo geral.....	20
7.2. Objetivo específicos .....	20
8. MÉTODOS.....	21
8.1. Manutenção do ciclo biológico da <i>T. crassiceps</i> .....	21
8.2. Tratamento dos cisticercos com diferentes dosagem de Niclosamida .....	22
8.3. Análise bioquímica dos cisticercos .....	23
8.4. Análise Estatística .....	24
9. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	25
10. CONCLUSÕES .....	33
11. RECOMENDAÇÕES .....	34
12. REFERÊNCIAS.....	35
13. ANEXOS .....	40
13.1. Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE.....	40
13.2. Anexo 2 - Cromatogramas.....	41

## 1. TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

---

### 1.1. Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i> .....	5
Figura 2. Estrutura química do praziquantel.....	9
Figura 3. Estrutura química do Albendazol.....	10
Figura 4. Estrutura da Niclosamida.....	11
Figura 5. Estrutura química do Dinitrofenol .....	11
Figura 6. Via de degradação da glicose pelo cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> . .....	16
Figura 7. Via de degradação da glicose em anaerobiose.....	17
Figura 8. Placa do tratamento do cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> (cepa ORF) com Niclosamida.....	22

### 1.2. Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentração de ácidos orgânicos (uM) secretado/excretado (S/E) no meio de cultura por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> expostos <i>in vitro</i> a diferentes concentrações de niclosamida – média e desvio padrão ( $\pm$ ).....	31
Tabela 2. Concentração médias (uM) de ácidos orgânicos no líquido intra- vesicular extraído dos cisticercos por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> presentes no meio de cultura (RPMI) expostos <i>in vitro</i> a diferentes concentrações de niclosamida.....	32

### 1.3. Lista de Anexos

Cromatograma 1. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 1 (somente RPMI) .....	41
Cromatograma 2. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 2 (Meio de cultura RPMI e cisticerco) .....	41
Cromatograma 3. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 3 (Meio de cultura RPMI, cisticerco e etanol) .....	42
Cromatograma 4. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 3 uM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 3 uM de Niclosamida) .	42
Cromatograma 5. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 2 uM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 2 uM de Niclosamida) .	43
Cromatograma 6. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 1 uM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 1 uM de Niclosamida) .	43
Cromatograma 7. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo controle 2 (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI).....	44
Cromatograma 8. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo controle 3 (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e etanol).....	44
Cromatograma 9. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 3 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 3 uM de Niclosamida) .....	45
Cromatograma 10. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 2 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 2 uM de Niclosamida) .....	45
Cromatograma 11. Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 1 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 2 uM de Niclosamida) .....	46

## 2. SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

AIDS – acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ANOVA – analyse of variance (análise de variância)

ATP – adenosine tryphosphate (adenosina trifosfato)

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CoA – Coenzima A

CoEp/UFG: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás

DNA– deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

DNP– dinitrophenol (dinitrofenol)

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzima imuno ensaio)

HCl – ácido clorídrico

HIV - human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)

HPLC – high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

IPTSP/UFG – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás

M – Molar = mol por litro (mol/L)

NADH – Nicotinamide adenine dinucleotide + 1 próton de Hidrogênio (H<sup>+</sup>) (Dinucleotideo de nicotinamida e adenina)

ND – não detectado

OAA - oxaloacetato

ORF – original fox

PEP – phosphoenolpyruvate (fosfoenolpiruvato)

PEPCK– phosphoenolpyruvate carboxykinase (fosfoenolpiruvato carboxiquinase)

SARS– Severe acute respiratory syndrome (Síndrome respiratória aguda grave)

SBCAL—Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SE – secreção/ excreção

Th1– T helper1 (Linfócito T auxiliares do tipo1)

RPMI – meio de cultura desenvolvido em Roswell Park Memorial Institute

### 3. RESUMO

---

Os estudos experimentais com o parasito *Taenia crassiceps* têm demonstrado alterações nas vias metabólicas (energética e respiratória) desse parasito, em resposta ao tratamento com fármacos. A utilização de *Taenia crassiceps* como modelo experimental oferece condições de se reproduzir a neurocisticercose, uma das formas mais graves da cisticercose humana. Este estudo tem como objetivo analisar a influência *in vitro* do fármaco anti-helmintico niclosamida, sobre o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF). Na realização deste estudo foram usados cisticercos em estágios larval de *T. crassiceps* (cepa ORF) e meio de cultura RPMI suplementado (Gibco). Foram utilizados 100 cisticercos, que foram alocados em placas de microcultura contendo seis poços, expostos ou não a niclosamida (1, 2 e 3 uM). Os grupos controle foram compostos por cisticercos não expostos ao fármaco e ao etanol na concentração utilizada para diluir o fármaco. Em seguida as placas foram à estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, os cisticercos foram retirados da cultura e ambos, parasito e meio de cultura, foram congelados em nitrogênio líquido. Na sequência os cisticercos foram processados para análise em HPLC. De acordo com o mecanismo de ação do fármaco, ou seja, interferência na cadeia transportadora de elétrons, nas concentrações utilizadas, observou-se uma alteração na secreção/ excreção do ácido orgânico succinato. As outras vias metabólicas não foram influenciadas pela ação deste fármaco. Portanto, conclui-se que a

niclosamida apresenta baixa influencia no metabolismo dos cisticercos nas concentrações utilizadas.

Palavras chave: ácidos orgânicos, *Taenia crassiceps*, metabolismo, niclosamida.

#### 4. ABSTRACT

---

Experimental studies with *Taenia crassiceps* have been used to demonstrate its metabolic alterations in biochemical pathways (energetic and respiratory) in response to the presence of drugs. The use of *T. crassiceps* as an experimental model offers conditions to reproduce the neurocysticercosis infection one of the most severe form of human cysticercosis. This study aimed the analysis of the *in vitro* influence of niclosamide, an antihelminthic drug, on the metabolism of carbohydrates and fatty acids of *T. crassiceps* cysticerci (ORF strain). 20 larval stage cysticerci were cultured into 5mL of RPMI (Gibco) supplemented culture media, in 6 well culture plates, exposed or not to niclosamide (1, 2, and 3 uM). The control groups were performed with cysticerci not exposed to the drug, exposed to ethanol in the concentration used to dissolve the drug. The cysticerci were cultured at 37°C for 24 hours. After this period the cysticerci were removed from the culture medium and both were frozen with liquid nitrogen. Afterward, the samples were processed for the HPLC analysis. Accordingly to the mode of action of this drug, which is to interfere in the electrons chain transport, the succinate concentrations were altered in the secretion/excretion of this parasite. Therefore, it is possible to conclude that in the concentrations used, this drug caused little alteration in the metabolic pathways of the parasite.

Key words: organic acids, *Taenia crassiceps*, metabolism, niclosamide

## 5. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

---

### 5.1. Características de *Taenia*

O gênero *Taenia* (Linnaeus) (Verster 1758) inclui parasitos de mamíferos carnívoros, que usam como hospedeiros definitivos, e herbívoros (ou onívoros), como hospedeiros intermediários. Os seres humanos infectam-se por ovos e formas larvais (de várias espécies), causando teníases ou cisticercose, respectivamente. A transmissão do parasito de um hospedeiro a outro segue um caminho trófico via ingestão. No entanto, as espécies do gênero *Taenia* são únicas entre o Cestoda ao exigir dois hospedeiros mamíferos obrigatórios para a transmissão e conclusão do ciclo de vida. Assim, o ovo ingerido pelo herbívoro ou onívoro atravessa a parede do intestino delgado e migra como oncosfera por via linfática ou hematogênica até órgãos e cavidades onde se desenvolve em larva metacestoide que é ingerido pelo carnívoro, o cestóide amadurece no carnívoro e libera ovos embrionados (Hoberg et al. 2000; Hoberg 2006).

*Taenia* é um dos dois gêneros na família Taeniidae que pertence à ordem Cyclophyllidea, classe Cestoda e filo Platyhelminthes. O outro gênero nessa família é *Echinococcus*, que também é de importância como causa de morbidade em humanos e animais pecuários (Jenkins et al. 2005; Jia et al. 2010; Thompson 2008). As espécies que desenvolvem em parasitos adultos de *Taenia* em humanos incluem *T. saginata* Goeze (1782), *T. asiatica* Eom & Rim (1993) e *T. solium* Linnaeus (1758), com as seguintes espécies zoonóticas capazes de desenvolver suas formas larvais também encontrados em seres humanos: *T.*

*taenia* (Batsch, 1786), *T. crassiceps* (Zeder, 1800), *T. multiceps* Leske (1780), e *T. serialis* (Gervais, 1847). Várias espécies de *Taenia* causam problemas de saúde significativos e prejuízos socioeconômicos consideráveis quando infectam seres humanos e animais (Murrell et al. 2005).

As infecções com *Taenia saginata*, *Taenia saginata asiatica* e *Taenia solium* são as únicas em que seus ciclos de vida são dependentes de seres humanos como o único hospedeiro definitivo. Além disso, os ciclos de vida são dependentes da ligação entre os seres humanos e bovinos (*T. saginata*) e suínos (*T. solium* e *T. s. asiatica*), de modo que qualquer interrupção destas ligações pode resultar na eliminação do parasito. Enquanto isso, aparentemente a prevenção e controle das teníases e cisticercose devem ser simples e prático, a realidade é que elas provaram-se quase intratáveis em muitas áreas por causa da disseminação de grande sucesso e características reprodutivas do parasito e por fatores culturais bem enraizados dos hospedeiros humanos (Flisser et al. 2005).

A infecção por *T. solium* é uma importante zoonose em muitos países onde os cidadãos se alimentam de carne de porco e é geralmente associada ao baixo desenvolvimento econômico. A prevalência da infecção por *T. solium* varia muito de acordo com o nível de saneamento, práticas de criação de suínos e hábitos alimentares de uma região. É muito difícil avaliar a prevalência de teníases por *T. solium*, porque os métodos utilizados para o levantamento coproscópico são tão ineficientes e, geralmente, não consegue diferenciar entre infecções por *T. solium* e *T. saginata*. Portanto, os dados sobre a prevalência de infecções por helmintos adultos são geralmente considerados muito conservadores. Da mesma forma, dados de prevalência com base em métodos sorológicos podem superestimar as

taxas de infecção porque a presença de anticorpos pode ser o resultado de exposição a ovos e infecção inicial, mas não persistente (Murrell et al. 2005)

A teníase é provocada pela presença da forma adulta de *T. solium* ou *T. saginata* no intestino delgado humano. A cisticercose é ocasionada pela presença da forma metacestódea ou cisticerco nos tecidos dos seus hospedeiros intermediários (Flisser et al. 2006). Desse modo, além de ser o hospedeiro definitivo, o homem pode ser infectado pelos ovos da *T. solium* desenvolvendo assim a cisticercose, cuja sintomatologia dependerá dos locais de instalação e desenvolvimento dos cisticercos (Vianna et al. 1991; Takayanagui & Odashima 2006). A neurocisticercose (NC) humana é a infecção do sistema nervoso central (SNC) pela forma metacestódea de *T. solium*, constitui uma das principais causas de epilepsia e desordens neurológicas em muitas nações. A NC tem considerável impacto social em áreas endêmicas (Hotez et al. 2008; Flisser et al. 2006).

As infecções por *T. saginata* em casos sintomáticos podem manifestar: dor abdominal, náusea, fraqueza, perda de peso, apetite aumentado, cefaleia, constipação intestinal, vertigem, diarreia, prurido anal e excitação. Nos casos mais típicos, após um período de incubação de dois ou três meses, surgem perturbação gastrintestinais, principalmente diarreia e dor epigástrica com caráter de dor de fome. Na infecção por *T. solium* não ocorre complicações, como apendicites ou outras devidas aos helmintos adultos. O quadro clínico, quando presente é semelhante ao da *T. saginata*. A gravidade desta infecção decorre do homem poder ser o hospedeiro intermediário. A doença resultante é a cisticercose humana podendo decorrer dela a neurocisticercose, oftalmocisticercose e a cisticercose disseminada, sendo as duas primeiras consideradas doenças de consequências severas ou de alto risco ao infectado (Rey 2008).

## 5.2. Característica de *Taenia crassiceps*

O parasito *T. crassiceps* é usado como modelo experimental amplamente manipulado do gênero *Taenia*. É um parasito cestóide de animais selvagens e domésticos, que acidentalmente pode afetar os seres humanos. A proliferação assexuada por brotamento é um atributo útil de cisticercos de *T. crassiceps*, o que permite às diferentes cepas serem mantidas indefinidamente na cavidade peritoneal de camundongos isotipos (Willms & Zurabian 2010).

Um número de cepas de *T. crassiceps* tem sido isolado para expansão em laboratório, entre elas estão HYG, KBS, Toi, a cepa mutante ORF e, mais recente do que as outras citadas, a cepa WFU obtida de uma infecção de roedor selvagem na América do Norte (Everhart et al. 2004).

Nos últimos 50 anos, os resultados experimentais usando estádios larvais e adultos de *T. crassiceps* renderam muitas informações sobre a morfologia, infectividade, dinâmica de proliferação, resposta imune do hospedeiro e pesquisa de vacinas que têm contribuído para o nosso conhecimento da biologia dos cestóides (Willms & Zurabian 2010).

No ciclo de vida desse parasito (Figura 1), os canídeos silvestres e/ou domésticos abrigam os helmintos adultos no intestino delgado, os ovos infectantes são liberados nas fezes os quais podem ser ingeridos por roedores silvestres, as oncosferas ao chegarem ao trato digestório, atravessam o epitélio intestinal e liberam o embrião hexacanto que penetra na mucosa e migra por via hematogênica e linfática, até se alojar em um determinado órgão ou cavidade, normalmente são as regiões subcutânea, cavidades pleural e abdominal, musculatura, sistema nervoso central e globo ocular, onde o embrião desenvolve-

se em larva metacestóide ou cisticerco que se multiplica por diversos brotamentos formados a partir de sua membrana externa (Esch & Smyth 1976; Freeman 1962; Shimalov & Shimalov 2003).

A detecção da forma larval pode ocorrer de 12 dias após a ingestão dos ovos. Cerca de 4 semanas após o aparecimento dos brotamentos, estes se destacam do cisticerco. A cepa ORF mesmo possuindo o canal do escólex não possuem o escólex na maioria dos brotamentos impossibilitando a progressão para o helminto adulto, porém continuam com a capacidade de executar a reprodução por brotamento. A eficiência na reprodução por brotamento é notavelmente aumentada com o tempo. As larvas metacestóides podem ser ingeridas pelo hospedeiro definitivo, se desenvolvendo no helminto adulto entorno de 30 a 70 dias após a infecção. Depois de 5 a 6 semanas de infecção os ovos ou as proglotes com os ovos podem ser encontradas nas fezes. Esta infecção pode se manter por até 9 meses no hospedeiro definitivo, evoluindo para a cura espontânea (Figura 1) (Freeman 1962; Maillard et al. 1998).

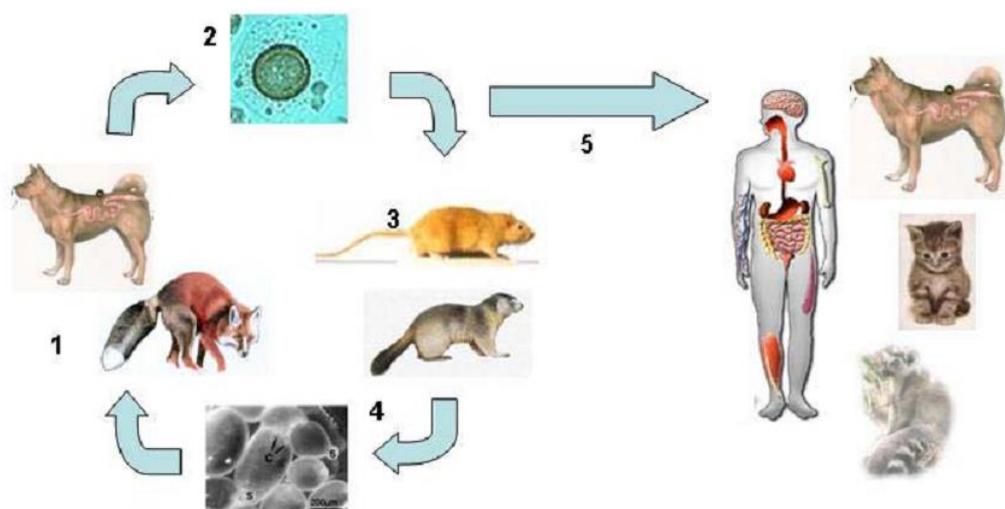


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps* (1) – canídeos, intermediários (3) - roedores, e paratênicos (5) - mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos (Adaptado de Vinaud et al. 2007)

Os cisticercos, geralmente encontrados em grande número, podem ser colhidos e injetados na cavidade peritoneal de camundongos isotipos e mantidos indefinidamente por séries de sub-inoculações (Esch & Smyth 1976; Freeman 1962; Shimalov & Shimalov 2003),

Em grande interesse para a pesquisa na biologia de parasitos da família Taeniidae é a capacidade da fase larval de multiplicar-se assexuadamente por brotamento no hospedeiro intermediário. Cerca de 11 espécies de um total de 45 pertencentes ao gênero *Taenia* apresentam reprodução assexuada na fase metacestóide (Hoberg et al. 2000; Hoberg 2006). Tal característica tem sido extensivamente utilizada desde as primeiras descrições por Freeman (1962), que demonstrou que o brotamento exógeno dos estágios larvais promove o crescimento exponencial do parasito. Em contraste com outros helmintos amplamente estudados, como *T. solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana* e *Echinococcus granulosus*; *T. crassiceps* não parasitam os seres humanos facilmente (Heldwein et al. 2006). Em consequência tornou-se um modelo experimental útil no laboratório, resultando em mais de 481 publicações ao longo dos últimos 50 anos (National Center for Biotechnology Information – NCBI - acessado em 12/12/2014).

Além disso, os antígenos e antígenos recombinantes de *T. crassiceps* demonstraram induzir altos níveis de proteção contra cisticercose experimental de *T. crassiceps* em murinos, um modelo experimental utilizado com sucesso para testar antígenos candidatos para uso em vacinas contra cisticercose suína por *T. solium*. A reação cruzada entre antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps* têm sido claramente demonstrada em outros estudos (Larralde et al. 1990; Espíndola et al. 2000).

A vacinação com antígenos de *T. solium* protegeu camundongos contra uma infecção com *T. crassiceps*, demonstrando que camundongos BALB/b machos imunizados com extrato de antígeno de *T. solium* ou *T. crassiceps* foram completamente protegidos contra a infecção com cisticercos. E enquanto, a proteção apenas parcial foi alcançada nos camundongos suscetíveis da linhagem BALB/c. A cisticercose suína foi diagnosticada através de ELISA indireto, por meio de um antígeno heterólogo de *T. crassiceps*, ou seja, que derivam de outras espécies (Biondi et al. 1996) e várias preparações antigênicas de *T. crassiceps* têm sido utilizadas no diagnóstico da neurocisticercose humana (Willms & Zurabian 2010).

A utilização de antígenos recombinantes foi descrita, KETc1, KETc12 e peptídeos sintetizados, obtidos a partir da cepa ORF, para imunizar camundongos e descobriu-se que a imunização com a KETc1 induzia de 66,7% a 100% de proteção contra a cisticercose em murinos, e a imunização com KETc12 induzia 52,7-88,1% de proteção. A resposta imunológica obtida indicou que ambos os peptídeos contêm pelo menos um epítipo de célula B e um epítipo de célula T que estimulou fortemente a proliferação de células T ativadas com o antígeno de peptídeo livre ou total de cisticercos de *T. crassiceps*. A elevada quantidade de células do baço expressando citocinas inflamatórias sugere o envolvimento de uma resposta Th1 na resposta imune. A capacidade de proteção dos peptídeos e sua presença em fases larval e adulta de *T. solium* indicam que estes dois epítipos são fortes candidatos para uso em uma vacina sintética contra cisticercose por *T. solium* (Sciutto et al. 2002; Toledo & Frago 2001).

Há várias espécies de animais como os ratos, ratazanas, coelhos, marmotas, lêmures, cães e gatos domésticos que podem ser acometidos pelos

cisticercos de *T. crassiceps* (Freeman 1962). O homem pode ser parasitado servindo como hospedeiro acidental desenvolvendo cisticercose. O aumento da incidência de casos em humanos pode ser devido principalmente à presença de animais domésticos infectados com o helminto adulto de *T. crassiceps* podendo ocorrer em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes (Arocker-Mettinger et al. 1992; Heldwein et al. 2006; Ntoukas et al. 2013). Nos casos relatados de cisticercose humana por *T. crassiceps* a grande parte dos pacientes apresentam imunodepressão devido aos tratamentos quimioterápicos ou infecção por HIV/AIDS. Nesses casos foram receitados como medicamentos o albendazol e praziquantel, sendo bem-sucedido em eliminar a infecção (Chermette et al. 1995; François et al. 1998; Heldwein et al. 2006).

A utilização de albendazol e praziquantel é o recomendado como tratamento de escolha para cisticercose causada por larva de *T. solium* ou *Cysticercus cellulosae*, administrados de acordo com uma escolha adequada dos pacientes e com um diagnóstico confiável. O praziquantel pertence ao grupo das isoquinolinas e derivados, os quais são compostos aromáticos policíclicos contendo uma porção isoquinolina, que consiste de um anel de benzeno fundido com um anel piridina e formando benzo[c]piridina (Figura 2). O praziquantel efetua a permeabilidade da membrana celular, resultando na contração de Schistosoma adultos. A fármaco provoca ainda mais a vacuolização e desintegração do tegumento de *Schistosoma* sp. . O efeito é mais acentuado em helmintos adultos do que em helmintos em estágios larvais. Um aumento do influxo de cálcio pode desempenhar um papel importante. Os efeitos secundários são a inibição da absorção de glicose, redução dos níveis de glicogênio e estimulação da liberação de lactato. A ação do praziquantel é limitada especificamente para Trematódeos e

Cestóides. Nematóides (incluindo filárias) não são afetados. (Doenhoff et al. 2008).

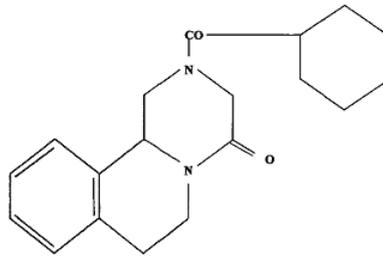


Figura 2. Estrutura química do praziquantel. (Frayha et al. 1997)

O albendazol (Figura 3) é um anti-helmíntico benzimidazol de grande espectro, estruturalmente relacionado com o mebendazol que é eficaz contra muitas doenças. Os benzimidazóis são compostos orgânicos contendo um anel de benzeno fundido com um anel de imidazol (anel de cinco membros contendo um átomo de azoto, de 4 átomos de carbono, e duas ligações duplas). É indicado para o tratamento da neurocisticercose parenquimatosa devido a lesões ativas causadas por formas larvais de *T. solium* e para o tratamento da hidatidose cística do fígado, pulmão e peritônio, causada pela forma larval de *E. granulosus*. O modo de ação principal do albendazol é pelo seu efeito inibitório sobre a polimerização da tubulina que resulta na perda de microtúbulos citoplásmicos. Este fármaco causa alterações degenerativas no tegumento e células intestinais do helminto através da ligação ao local sensível à colchicina da tubulina, inibindo assim a sua polimerização ou montagem em microtúbulos. A perda dos microtúbulos citoplasmáticos leva a absorção prejudicada de glicose pelos estágios larvais e adultos dos parasitos suscetíveis, e esgota as suas reservas de glicogênio. As alterações degenerativas no retículo endoplasmático, as mitocôndrias da camada germinal, e a subsequente liberação de lisossomas

resulta na diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP), que é a energia necessária para a sobrevivência do helminto. Devido à diminuição da produção de energia, o parasita é imobilizado e eventualmente morre. (Haque et al. 1993; Oxberry et al. 2000; Ramírez et al. 2001).

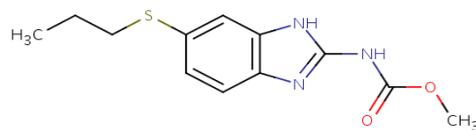


Figura 3. Estrutura química do Albendazol (DrugBankK acessado 30/03/2015 as 21:40h em <http://moldb.wishartlab.com/molecules/DB00518/image.png>)

### 5.3. Niclosamida (5-chloro-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide)

A Niclosamida (Figura 4) é um derivado halogenado da salicilamida. É um fármaco com ação anti-helmíntica utilizada por cerca de 50 anos para tratar a maioria das infecções intestinais causadas por *T. solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Dipylidium caninum* e *Diphyllobothrium latum*. Apesar de não ser eficiente contra cisticercose ou hidatidose. Além de ser usado como moluscicida para o tratamento de água em programas de controle da esquistossomose (Frayha et al. 1997; Weinbach & Garbus 1969).

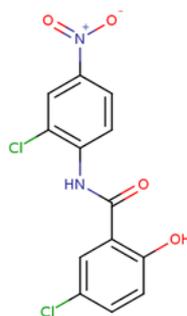


Figura 4. Estrutura da Niclosamida (DrugBankK, acessado em 07/02/2015 as 20:30h em <http://moldb.wishartlab.com/molecules/DB06803/image.png>)

Existem evidências consideráveis de que a niclosamida interfere com o metabolismo energético de helmintos, inibindo a formação dos microtúbulos através do bloqueio da captação de glicose, resultando na depleção de glicogênio do parasito. Isso ocorre possivelmente pela inibição da produção de adenosina trifosfato (ATP), necessários para a sobrevivência e reprodução dos parasitos. Isto pode ser devido à inibição do fármaco à fosforilação oxidativa ou a propriedade dela de estimular ATPase. Nota-se que a niclosamida possui uma semelhança estrutural com o dinitrofenol (DNP), demonstrado na Figura 5, que lhe permite desacoplar a fosforilação oxidativa na mitocôndria do parasito durante o transporte de elétrons do NADH para flavoproteína (Frayha et al. 1997; Philip 2015).

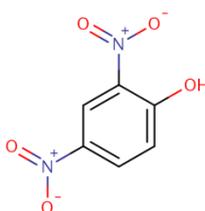


Figura 5. Estrutura química do Dinitrofenol (DrugBank acessado 09/04/2015 as 18:45h em <http://moldb.wishartlab.com/molecules/DB04528/image.png>)

A consequência é a paralisia e morte dos helmintos, os quais são eliminados com as fezes. A niclosamida não interfere no metabolismo da glicose no homem devido o sistema microtubular das células do hospedeiro ser diferente daquele dos helmintos. A niclosamida apresenta absorção insignificante pelo trato gastrointestinal, permanecendo por período prolongado em contato com os parasitas intestinais. É eliminada pelas fezes na forma inalterada (Philip 2015).

Há descoberto que a niclosamida é ativa contra as células cancerígenas, embora o seu mecanismo de ação antitumoral exato não seja totalmente compreendido. As evidências sugerem que a niclosamida possui múltiplas vias de sinalização a maioria dos quais estão intimamente envolvidos com a proliferação de células-tronco do câncer (Pan et al. 2012).

Há também na literatura relatos da ação da niclosamida ser capaz de inibir a replicação de um coronavírus causador do SARS. Além de alguns compostos derivados inibirem a replicação do vírus da gastroenterite transmissível em suínos (Krátký & Vinsová 2011). No trabalho de Brett et al. (2003) evidenciaram-se também a interação da niclosamida com DNA sugerindo que sua toxicidade pode ser causada por essa interação após ativação redutiva que foi detectada pela metodologia de DNA-biosensor utilizada por eles. A niclosamida tem sido apontada para o tratamento de vários tipos diferentes de câncer como, por exemplo, de mama, próstata, ovário, glioblastoma, leucemia, entre outros. Além de novas aplicações para este fármaco, é importante ressaltar que seu uso para tratamentos teciduais está sendo sempre indicado em baixas concentrações, como 1-5 uM (Fenner 2014; Li et al. 2014; Liu et al. 2014; King et al. 2014).

## 5.4. Metabolismo

Os parasitos são dependentes da disponibilidade de substâncias encontradas no organismo do hospedeiro, como carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais, além de purinas, nucleosídeos, ácidos graxos, esteróis e porfirinas. Essas demandas nutricionais são adquiridas pelas células por meio de difusão passiva, facilitada e transporte ativo. Os helmintos também podem realizar processos de endocitose de macromoléculas, como proteínas para utilização como fonte de componentes constitucionais, como aminoácidos, monossacarídeos, nucleotídeos ou lipídeos (Köhler & Voigt 1988).

Há grande variação na demanda de oxigênio e a capacidade para utilização em estágios de desenvolvimento diferentes de helmintos e a situação em uma espécie pode não ser necessariamente relevante à outra espécie (Köhler & Voigt 1988).

Com base nos produtos finais da via glicolítica e seu metabolismo adicional, helmintos parasitos podem ser classificados em três tipos: (1) Helmintos parasitos que usam a via glicolítica completa e exporta o produto final, o piruvato, na mitocôndria para uma maior degradação através do ciclo do ácido tricarboxílico. Esta degradação aeróbia ocorre principalmente em estágios larvais de cestóides, trematodeos e nematóides; (2) Aqueles que usam a via glicolítica completa, mas convertem no citoplasma o seu produto final, o piruvato, para produtos finais tais como lactato e etanol. Este processo de fermentação, a chamada glicólise 'anaeróbia', ocorre em *Schistosoma* spp. adultos, filarias e outros nematódeos; (3) Aqueles que usam a via glicolítica clássica somente até fosfoenolpiruvato (PEP). Então, em vez de converter PEP para piruvato, PEP é

carboxilado pela PEP carboxiquinase (PEPCK) a oxaloacetato, que é posteriormente reduzido para malato. Esta parte da via ocorre no citosol e está em equilíbrio redox produzindo 2 mols de ATP por 1 mol de glicose degradada. Em seguida o malato é transportado para dentro da mitocôndria para o metabolismo anaeróbio. Esta via é comum em muitos helmintos parasitos, especialmente nos helmintos intestinais como *Ascaris suum* (Tielens 1994; Komuniecki et al. 2003)

Na fase larval, o cisticerco da *T. crassiceps*, demonstra um comportamento aeróbio (Figura 6) *in vivo* dependente de oxigênio que se difunde através dos tecidos de seu hospedeiro. O metabolismo energético de cestoides sofre variação devido à influência direta da disponibilidade de oxigênio no ambiente circundante do parasito (Köhler & Voigt, 1988; Arenal et al. 2001).

O catabolismo da glicose em cisticerco de *T. crassiceps* produz piruvato (Figura 6) por meio da piruvato quinase sobre fosfoenolpiruvato. Esse composto pode passar pela ação da enzima lactato desidrogenase gerando lactato, este pode ser excretado ou usado na via da gliconeogênese. Este lactato pode sofrer a catálise da transaminase produzindo alanina, que poderá ser excretada (Corbin et al. 1998; Komuniecki et al. 2003; Zenka & Prokopic 1985).

Enfim esse mesmo piruvato pode ser usado no interior da mitocôndria. O piruvato também pode ser produzido na mitocôndria pela enzima málica agindo sobre o malato. O piruvato mitocondrial é convertido em Acetil-coA gerando acetado ou citrato ao reagir com oxalacetato. Os produtos finais do metabolismo *in vitro* de carboidratos em *Taenia crassiceps* são: lactato e alanina; e do metabolismo respiratório são: acetato, citrato e succinato (Corbin et al. 1998; Komuniecki et al. 2003; Vinaud et al. 2007; Zenka & Prokopic 1985).

Outro ácido que integra o ciclo do ácido cítrico é o fumarato produzido pela catálise da enzima fumarase no malato. A fumarato redutase pode agir sobre o fumarato desenvolvendo uma reação inversa originando succinato. O succinato pode doar prótons para a cadeia respiratória em aerobiose ou pode ser excretado em anaerobiose (Corbin et al. 1998).

Os representantes da família *Taeniidae* produz em anaerobiose (Figura 7) o fosfoenolpiruvato podendo originar piruvato e lactato ou originar oxaloacetato que será transformando em malato. Este, que tem a função de manter o equilíbrio redox, é transferido à mitocôndria produzindo os produtos finais excretados: propionato, acetato ou ácidos graxos voláteis como metilbutirato ou metilvalerato. As fases larvais dessa família apresentam maiores capacidades de oxidação do que suas respectivas fases adultas. É provável que ocorra por apresentarem tamanhos menores em relação aos adultos que facilitaria a difusão de oxigênio pelos tecidos do parasito adicionado ao maior aporte de oxigênio fornecido pelo hospedeiro (Köhler & Voigt 1988).

Em cisticercos de *T. crassiceps* a cadeia transportadora de elétrons é semelhante à cadeia encontrada em seus hospedeiros mamíferos, demonstrando presença de citocromos bc1, c e aa3, enquanto este tipo de respiração é ausente em parasitos adultos (Del Arenal et al. 2001). Uma via respiratória alternativa no metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps* se mostra bastante complexa ao ser resistente à inibição da enzima citocromo oxidase por cianeto (Del Arenal et al. 2005).

A incapacidade de muitos helmintos de sintetizar lipídios torna-os dependentes da captação dessas substâncias do ambiente no hospedeiro podendo ser utilizados como recurso alternativo à glicose. Os ácidos graxos

absorvidos são armazenados em triacilglicerol e fosfolípídeos situados na membrana cística e tegumento de cestodeos (Köhler & Voigt, 1988; Vinaud et al. 2009).

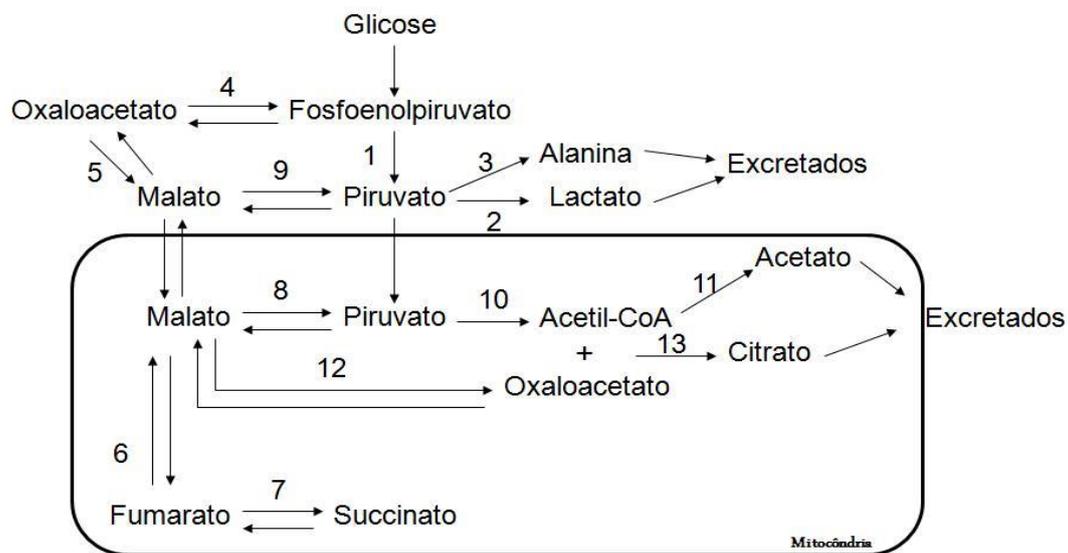


Figura 6. Via de degradação da glicose pelo cisticerco de *Taenia crassiceps*. 1: piruvato quinase; 2: lactato desidrogenase; 3: alanina transferase; 4: fosfoenol piruvato carboxiquinase; 5: malato desidrogenase citosólica; 6: fumarase; 7: fumarato redutase; 8: enzima málica mitocondrial; 9: enzima málica citosólica; 10: complexo piruvato desidrogenase; 11: acetoacetato descarboxilase; 12: malato desidrogenase mitocondrial; 13: citrato sintase (Adaptado de Corbin et al. 1998).

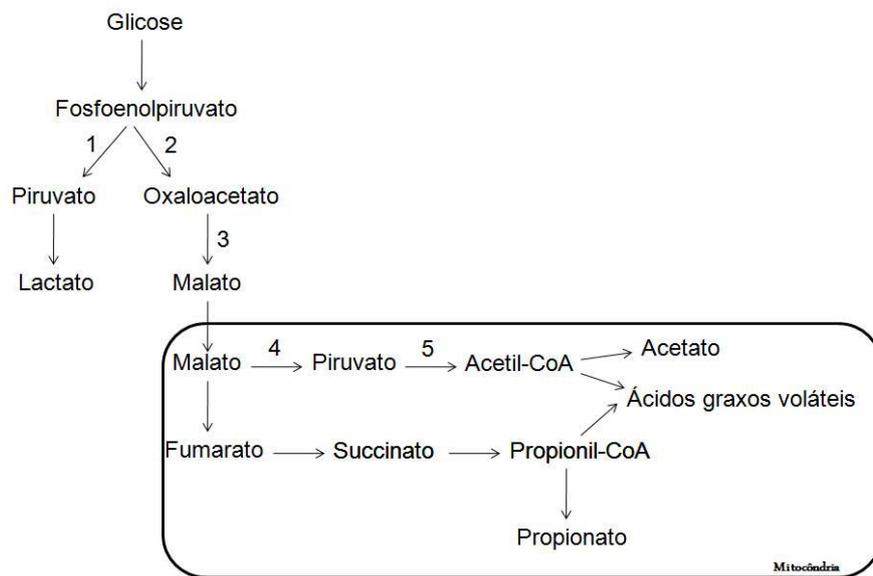


Figura 7. Via de degradação da glicose em anaerobiose. 1: piruvato quinase; 2: fosfoenol piruvato carboxiquinase; 3: malato desidrogenase citoplasmática; 4: enzima málica; 5: complexo piruvato desidrogenase (Adaptado de Köhler & Voigt 1988).

## 6. JUSTIFICATIVA

---

Os fármacos albendazol e praziquantel são utilizados em tratamentos de cisticercose, sendo que este último tem apresentado melhora significativa no quadro clínico dos pacientes. Embora, o praziquantel tenha sido muito indicado no tratamento de neurocisticercose, a eficácia deste fármaco para a cura de Neurocisticercose (NCC) é cerca de 40% à 50% na dose recomendada. Além disso, às complicações da doença, o tratamento requer períodos de meses a anos.

A Niclosamida é um fármaco bastante indicado para o tratamento de teníases. Os estudos experimentais têm demonstrado que a niclosamida inibe a fosforilação oxidativa ou a propriedade desta em ativar a enzima ATPase.

Estudos experimentais com *T. crassiceps* têm demonstrado alterações nas vias metabólicas (energética e respiratória) desse parasito, em resposta aos tratamentos com praziquantel.

A grande vantagem da utilização deste modelo reside no fato de que: a) a *T. crassiceps* é um parasito similar a *T. solium*, possuindo antígenos comuns, b) o modelo experimental oferece condições de se reproduzir a neurocisticercose humana, c) o acompanhamento, estudo do desenvolvimento e tratamento da cisticercose murina por *T. crassiceps* possibilita o estudo de mecanismos de resistência e susceptibilidade ao cisticerco, além de outras vantagens.

A presente pesquisa visa uma análise exploratória sobre o metabolismo de carboidratos e de oxidação de ácidos graxos de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) *in vitro* diante da niclosamida um fármaco anti-helmíntico.

Há estudos recentes demonstrando a utilização da niclosamida no tratamento de várias doenças teciduais, principalmente câncer. Desse modo, há

o interesse em se conhecer melhor o comportamento dos ácidos orgânicos frente à niclosamida mesmo em aerobiose realizada pelo cisticerco *in vitro*. Isso pode fornecer informações mais detalhadas sobre as diferenças entre anaerobiose da tênia adulta em relação à aerobiose da fase larvária.

Assim, o estudo bioquímico do metabolismo de parasitos pode disponibilizar dados ao esclarecimento de como esses organismos conseguem se adaptar a diferentes ambientes, como o trato intestinal do hospedeiro, que é anaeróbico com abundância de nutrientes, ou aos tecidos do hospedeiro, que é aeróbico com menor aporte nutricional.

Além disso, a análise bioquímica de endoparasitos podem elucidar vias metabólicas diferentes entre o parasito e o seu hospedeiro mamífero sendo de interesse o conhecimento de novos alvos para atuação de fármacos. Estas pesquisas *in vitro* sobre o metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps* descreveram vias do metabolismo aeróbico como a cadeia transportadora de elétrons, a via das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico. E estudos *in vitro* como este podem relatar alterações bioquímicas e metabólicas, como a diminuição de secreção/excreção de lactato, após a exposição dos cisticercos a certo fármaco. Enfim, estudos *in vitro* a respeito da resposta bioquímica e metabólica de parasitos diante da niclosamida são raros, o que aponta para a relevância do aprofundamento de pesquisas científicas neste âmbito.

## 7. OBJETIVOS

---

### 7.1. Objetivo geral

Analisar os aspectos bioquímicos de cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vitro* sob a ação do fármaco anti-helmíntico niclosamida amplamente utilizado no tratamento de teníases.

### 7.2. Objetivo específicos

7.1 Detectar e quantificar *in vitro* ácidos orgânicos do metabolismo da via da glicólise aeróbia e anaeróbia: piruvato e lactato, respectivamente, na fase larval do cisticerco de *T. crassiceps* (ORF) após o tratamento com dosagens subletais de niclosamida.

7.2. Detectar e quantificar *in vitro* ácidos orgânicos do metabolismo do ciclo do ácido tricarboxílico: oxaloacetato, citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato, fumarato e malato, na fase larval do cisticerco de *T. crassiceps* (ORF) após o tratamento com dosagens subletais de niclosamida.

7.3. Detectar e quantificar *in vitro* ácidos orgânicos da oxidação de ácidos graxos: acetato, acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e propianato, na fase larval do cisticerco de *T. crassiceps* (ORF) após o tratamento com dosagens subletais de niclosamida.

## 8. MÉTODOS

---

### 8.1. Manutenção do ciclo biológico da *T. crassiceps*

Os cisticercos de *T. crassiceps* são obtidos por meio do ciclo biológico (cepa ORF) mantido no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) desde 2002. Foram inoculados cerca de 10 cisticercos em estágio inicial na cavidade intraperitoneal de camundongos fêmea BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, onde se reproduzem por brotamento. Após 90 dias de inoculação os animais foram eutanasiados e necropsiados. Foram retirados os cisticercos da cavidade intraperitoneal e foram selecionados 10 em estágio inicial (Vinaud et al 2007), que foram inoculados em outros camundongos não infectados para dar continuidade ao ciclo (Espindola et al. 2002; Vaz et al. 1997).

Os princípios éticos em experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) foram obedecidos e o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CoEp/UFG) (protocolo número 050/13). Os camundongos receberam cuidados diários, água acidificada e ração padrão para a espécie à vontade.

## 8.2. Tratamento dos cisticercos com diferentes dosagem de Niclosamida

Em placas com seis poços, todas contendo meio de cultura RPMI® suplementado (Gibco), foram divididas em três controles e três dosagens diferentes do fármaco (Figura 8). Em cada poço foram usados 20 cisticercos em estágio larval de *T. crassiceps* (cepa ORF), exceto para o controle 1 (Somente contendo meio RPMI). As placas foram colocadas em estufa por 24 horas a 37°C às seguintes concentrações de niclosamida: 1 µM, 2 µM e 3 µM, juntamente com os controles 1, 2 e 3.

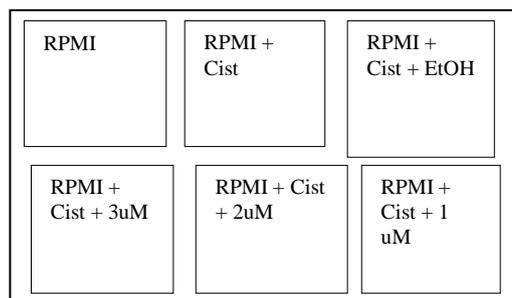


Figura 8. Placa do tratamento do cisticerco de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) com Niclosamida. RPMI: controle contendo somente meio RPMI; RPMI+Cist: controle 2 contendo meio RPMI e cisticerco em estágio larval; RPMI+Cist+ EtOH: controle 3 contendo meio RPMI, cisticerco estágio larval e etanol (usado para dissolver o fármaco); RPMI+Cist+3uM, 2uM e 1uM: poços contendo respectivamente 3uM, 2uM e 1 uM de Niclosamida, meio RPMI e cisticerco no estágio larval.

O experimento foi realizado em 6 repetições. As dosagens utilizadas foram determinadas a partir da recomendação dos fabricantes e dissolvidas em etanol de acordo com Tomlin (1994), sendo então calculada uma dose menor do que a necessária para eliminar o parasito, visto que o objetivo deste trabalho foi avaliar as adaptações do parasito frente ao fármaco.

### 8.3. Análise bioquímica dos cisticercos

Os cisticercos foram retirados da estufa após 24 horas de exposição e foram fixados em nitrogênio líquido como descrito por Vinaud et al. (2007). Em seguida procedeu-se a extração dos ácidos orgânicos para a análise cromatográfica, como descrito por Bezerra et al. (1999).

A extração dos ácidos orgânicos nos meios de cultura foi realizada por meio de uma coluna cromatográfica de troca iônica (Bond Elut® - Varian). Foi utilizado um sistema acoplado à uma bomba a vácuo, ativou-se a coluna de extração com 1 mL de HCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>), 1 mL de Metanol e 2 mL de H<sub>2</sub>O ultrafiltrada. Depois foi adicionado 1 mL da amostras. Após, foram acrescentados 2 mL de água ultrafiltrada e a coluna foi retirada da bomba a vácuo. Em seguida foram aplicados 250 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M) e centrifugado à 2000 g/5 minutos à 10°C (Bezerra et al. 1999).

A amostra resultante foi submetido a uma análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – Varian ProStar) com uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex ion exclusion HPX – 87H (300 X 7,8 mm). A coluna de separação é protegida por uma coluna de proteção BIORAD-Aminex HPX – 85. O eluente utilizado na fase móvel foi o ácido sulfúrico (5 mMol.L<sup>-1</sup>), com vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, acoplado a um detector UV/visível em comprimento de onda de 210nm. Cada amostra injetada corresponde a um volume de 50 µL (Bezerra et al. 1999; Vinaud et al. 2007, 2008, 2009; Fraga et al. 2012a, 2012b, 2012c).

Os resultados foram analisados por um software PROSTAR® conectado ao cromatógrafo calibrado para identificar os seguintes ácidos orgânicos do metabolismo de ácidos orgânicos: Piruvato, Lactato, Oxaloacetato, Citrato, α-

cetoglutarato, Succinato, Fumarato, Malato, Acetato, Acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e Propionato.

O procedimento acima descrito possibilitou a análise dos ácidos orgânicos do líquido vesicular. Este procedimento foi realizado para a análise dos ácidos orgânicos secretados/excretados (S/E) através da análise do meio de cultura, seguindo protocolo de análise bioquímica.

#### 8.4. Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi processada pelo programa Sigma Stat 2.3. A estatística descritiva foi executada para determinação da média e desvio padrão, e para avaliar as diferenças entre os grupos analisados, essas variáveis obtidas foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando ao apresentarem distribuição normal utilizou-se análise da variância. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 9. RESULTADOS e DISCUSSÃO

---

A excreção de ácidos orgânicos referentes ao metabolismo da via da glicólise aeróbio e anaeróbio, via do ciclo do ácido tricarboxílicos e a via de oxidação de ácidos graxos em cisticercos de *T. crassiceps in vitro* e diante de diferentes concentrações da niclosamida foi detectada e analisada, gerando assim um perfil metabólico do cisticerco frente ao uso desse fármaco *in vitro*.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada sobre as médias  $\pm$ desvio-padrão dos dados amostrais obtidos, vistos nas Tabelas 1 e 2. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e os grupos tratados com a niclosamida em relação aos ácidos detectados e dosados tanto na produção destes ácidos no fluido vesicular quanto na secreção/excreção (S/E) destes ácidos pelos cisticercos no meio de cultura expostos às doses de niclosamidas usadas neste trabalho. Há exceção do grupo tratado com o fármaco nas concentrações de 1, 2 e 3  $\mu\text{M}$  ( $10^{-6}\text{mol.L}^{-1}$ ) em relação ao grupo controle quando dosada a S/E de succinato no meio onde foi cultivado os cisticercos, no qual houve diferença estatisticamente significativa detectada entre o succinato do grupo tratado em relação ao controle.

Apesar desse resultado estatístico, nota-se nas Tabelas 1 e 2 que há uma diferença entre as médias  $\pm$ desvio-padrão do grupo controle quando se comparada com as dos grupos tratados. O que sugere a presença de interferência ocasionada pelo fármaco sobre as vias metabólicas desses ácidos.

Ressaltasse que foram feitos testes estatísticos entre dois grupos controles sendo um contendo RPMI+cisticerco e o outro contendo RPMI+cisticerco+etanol

para verificar se o etanol, usado para dissolver o fármaco em solução, interferia na análise das dosagens usando o fármaco em comparação ao controle sem o fármaco. Nessa análise não se evidenciou qualquer diferença estatística significativa entre esses dois grupos controle.

Desse modo, ao analisar a produção de ácidos orgânicos por cisticercos de *T. crassiceps* tratados *in vitro* com 1uM, 2uM e 3 uM de niclosamida, foi possível detectar a produção de piruvato, mas não de lactato. Estes são ácidos orgânicos presentes na via da glicólise. Mesmo não havendo diferença estatística significativa do piruvato detectado nos grupos controles em relação aos tratados nota-se que há o direcionamento do cisticerco para a realização de catabolismo aeróbio com a evidência dos níveis de piruvato constantes entre os grupos testados, enquanto os de lactato não foram detectados. O piruvato pode ter sido consumido em níveis elevados pelo ciclo do ácido cítrico. A preferência do cisticerco de *T. crassiceps*, no estágio larval, pelo metabolismo aeróbio foi descrito por Vinaud et al. (2008). Eles verificaram um predomínio da via aeróbia explicado pela detecção dos ácidos orgânicos referentes ao ciclo do ácido cítrico com taxas de concentrações mantidas em todas as fases evolutivas e diante de fármacos anti-helmínticos como Praziquantel e o Albendazol.

Observa-se também na Tabela 1 que há uma quantidade de lactato dosado na S/E do cisticerco no grupo controle e não se consegue detectar as concentrações desse ácido na S/E dos grupos tratados. Isso pode ser explicado pela a ação do fármaco que age com mais eficácia sobre a via de metabolismo anaeróbio, por isso é indicado para helmintos na fase adulta (Frayha et al. 1997; Weinbach & Garbus 1969) e não para a fase larval, que possui o metabolismo aeróbio conforme constatado por Vinaud et al. (2008). Isso explica no cisticerco a

presença de uma certa concentração do piruvato seguir a via mitocondrial, consumido pelo ciclo do ácido cítrico, sendo substrato do complexo piruvato desidrogenase, gerando Acetil-CoA. O piruvato mitocondrial também pode ter sua origem pela conversão à malato mitocondrial que passa para o interior da mitocôndria e pode ser convertido tanto ao Piruvato quanto ao Fumarato, este também pode acarretar ao aumento consequente de succinato (Corbin et al. 1998). O lactato pode não ter sido detectado no grupo controle do metabolismo da via glicolítica anaeróbia no líquido vesicular produzido pelo cisticerco por ter sido excretado.

Os ácidos orgânicos que indicam o ciclo do ácido cítrico: oxaloacetato, citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, malato e fumarato não demonstraram diferenças estatísticas significativas nas concentrações identificadas, tanto na S/E quanto na produção pelos cisticercos, entre o grupo controle e o grupo tratado (Tabelas 1 e 2). É provável que o fármaco, nas concentrações utilizadas, não influenciam os mecanismos catalíticos de ação das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase, malato desidrogenase citossólica e mitocondrial, citrato sintase, enzima málica mitocondrial e citossólica, malato desidrogenase citossólica e mitocondrial, fumarase e fumarato redutase.

Vinaud et al. (2008) apesar de terem usado fármacos diferentes da niclosamida, compartilham esses mesmos resultados aos ácidos orgânicos citados no começo deste parágrafo. Já Fraga et al. (2012c) demonstraram dados diferentes quanto as alterações nas concentrações desses ácidos frente a interação do praziquantel e o albendazol, mas são resultados obtidos *in vivo* o que identifica a metabolização do fármaco pelo hospedeiro, levando a metabólitos

ativos mais eficazes contra o parasito, como relatado pelos próprios autores deste trabalho ao comparar os resultados com o de Vinaud et al (2008).

As concentrações do succinato S/E no grupo controle em relação aos grupos expostos ao fármaco foram detectadas diferenças estatísticas significativas quando analisadas. Isso sugere a influência da niclosamida em induzir maior S/E desse ácido. Frayha et al. (1997) e Philip (2015) sugerem que a niclosamida interfere no metabolismo energético de helmintos, principalmente no metabolismo anaeróbio, nesse caso ocasionando mais danos à forma adulta da *Taenia*, inibindo a formação dos microtúbulos através do bloqueio da captação de glicose, resultando na depleção de glicogênio dos parasitos e possivelmente pela inibição da produção de adenosina trifosfato (ATP), necessários para a sobrevivência e reprodução dos parasitos.

Isto pode ser devido à inibição do fármaco à fosforilação oxidativa ou a propriedade dela de estimular ATPase. Nota-se que niclosamida possui uma semelhança estrutural com o dinitrofenol (DNP). Esta molécula realiza o desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria do parasito durante o transporte de elétrons do NADH para flavoproteína (Frayha et al. 1997; Philip 2015), sugerindo que, devido a semelhança estrutural DNP com a niclosamida, também possa permitir o mesmo efeito citado sobre a mitocôndria. Assim, o succinato não foi utilizado na cadeia transportadora de elétrons, mas deve ter sido excretado.

Também é ciente que o complexo succínico desidrogenase de helmintos do fígado, como em Fasciolose e Paragonimíase, é muito vulnerável e que é inibido seletivamente por bitionol, este é um difenil sulfureto halogenado, e outros fármacos quimicamente relacionados, tal como as salicilanilidas (por exemplo,

niclosamida), diclorofeno e hexaclorofeno. O bitionol tem um efeito de separação na fosforilação oxidativa proibindo assim a formação de ATP nos parasitos (James & Gilles 1985).

O succinato em invertebrados é um ácido orgânico que pode ser excretado como produto final e utilizado para conversão à propionato (Corbin et al. 1998). Além de poder ser utilizado via succinato desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons na fase do complexo II da cadeia respiratória, pois Del Arenal et al. (2001) demonstraram que as mitocôndrias de cisticercos de *T. crassiceps* possuem proteínas como citocromo bc1, c e aa3, as quais, nos vertebrados, fazem parte da cadeia transportadora de elétrons e o succinato é o primeiro composto a entrar nesta cadeia, sendo, portanto utilizado nesta via.

Nas concentrações do succinato produzidos intracelular não foi verificado diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com o fármaco. É provável que o succinato produzido fosse liberado para o meio.

Os produtos finais do metabolismo de carboidratos em *T. crassiceps* são lactato, acetato, succinato e alanina. No metabolismo respiratório são acetato, citrato e succinato o que sugere a existência de vias tanto citoplasmáticas quanto mitocondriais de produção de energia (Corbin et al. 1998; Vinaud et al. 2007; 2008).

Na análise estatística das concentrações dos ácidos relacionados às vias metabólicas referentes à oxidação de ácidos graxos ( $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato, acetato e propionato) não houve diferença estatística significativa ao avaliar tanto a S/E no meio de cultura quanto no líquido intra-vesicular extraído dos cisticercos destes ácidos pelo cisticerco. É notável que não foram detectados os ácidos Acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato, acetato e propionato tanto no grupo

controle como nos grupos tratados nos líquidos vesiculares extraídos dos cisticercos, mas somente na S/E desses ácidos. Vinaud et al. (2009), em estudo *in vitro*, e Fraga et al. (2012a), *in vivo*, também não detectaram diferença na produção de acetato por cisticercos de *T. crassiceps*.

O acetato não detectado nos grupos amostrais dos cisticercos citados pode ter combinado com o acetil-CoA dando origem ao acetoacetil-CoA, que se condensou com o acetil-CoA para formar  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, o qual é quebrado para formar acetoacetato livre e acetil CoA (Lenhinger et al. 2006).

Os ácidos  $\beta$ -hidroxibutirato, acetato e propionato foram detectados na S/E dos cisticercos de *T. crassiceps*, tanto no grupo controle como nos tratados com o fármaco. O que sugere a excreção desses ácidos na célula para o meio de cultura. Vinaud et al. (2009) e Fraga et al. (2012a) expõem em suas pesquisas um panorama diferente de comportamento para o ácido  $\beta$ -hidroxibutirato demonstrando a influência dos fármacos usados (praziquantel e albendazol) sobre o metabolismo do ácido cítrico e a glicólise, o que levaria o uso de uma via alternativa de captação de energia, nesse caso a via de ácidos graxos.

Há uma ressalva a ser feita quanto à concentração do ácido propionato na S/E dos grupos controles quando se comparado aos grupos tratados, mesmo não identificando diferença estatística significativa entre eles. Observando-se as médias do grupo controle com as dos três grupos tratados distintos, percebe-se uma diferença evidente entre eles, onde se encontra uma maior média das concentrações dos controles em relação aos grupos tratados, sugerindo que a conversão de succinato à propionato foi influenciada nos grupos tratados, justificando a diminuição de propionato sobre a ação das diferentes concentrações de niclosamida.

É possível que a ação da niclosamida sobre complexo succínico desidrogenase de helmintos, citadas por James & Gilles (1985), possa ter interferido na conversão de succinato à propionato diminuindo as concentrações desse ácido nos grupos tratados.

Esses resultados acabam por indicar que a niclosamida, nas concentrações utilizadas não bloqueiam o ciclo do ácido cítrico ou ciclo do ácido tricarboxílico, confirmando a preponderância do metabolismo em aerobiose nos cisticercos (estágio larval) como via de produção de energia, tendo em vista que o efeito do mecanismo da ação do fármaco é acentuado sobre a forma adulta da *Taenia*, ou seja, sobre o metabolismo anaeróbio.

Tabela 1. Concentração de ácidos orgânicos (uM) secretado/excretado (S/E) no meio de cultura por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos in vitro a diferentes concentrações de niclosamida – média e desvio padrão ( $\pm$ ).

	Controle	Niclosamida 1uM	Niclosamida 2uM	Niclosamida 3uM
Oxaloacetato	17,29 $\pm$ 16,05	46,80 $\pm$ 33,59	47,02 $\pm$ 31,55	73,74 $\pm$ 52,96
Citrato	95,47 $\pm$ 63,98	225,07 $\pm$ 150,02	296,43 $\pm$ 240,96	322,03 $\pm$ 323,31
$\alpha$ -cetogluturato	5,62 $\pm$ 5,53	9,98 $\pm$ 5,85	7,37 $\pm$ 8,78	10,88 $\pm$ 14,55
Piruvato	16,81 $\pm$ 17,77	20,99 $\pm$ 19,75	13,87 $\pm$ 14,08	28,35 $\pm$ 30,06
Malato	121,95 $\pm$ 109,97	187,12 $\pm$ 170,66	244,13 $\pm$ 211,51	259,52 $\pm$ 206,04
Succinato	1213,75 $\pm$ 757,27	2607,63 $\pm$ 1483,03	3156,69 $\pm$ 2138,16	2979,92 $\pm$ 1567,69
Lactato	807,10 $\pm$ 492,72	ND	ND	ND
$\beta$ -hidroxibutirato	430,07 $\pm$ 424,74	415,96 $\pm$ 419,20	335,62 $\pm$ 372,59	704,06 $\pm$ 666,24
Acetoacetato	149,94 $\pm$ 90,37	165,59 $\pm$ 112,59	152,01 $\pm$ 71,00	236,38 $\pm$ 18,51
Acetato	1035,65 $\pm$ 846,81	1549,50 $\pm$ 1417,91	1268,21 $\pm$ 1091,94	1545,42 $\pm$ 1351,59
Fumarato	27,35 $\pm$ 16,42	32,08 $\pm$ 22,18	46,54 $\pm$ 33,93	46,41 $\pm$ 34,41
Propionato	343,81 $\pm$ 684,35	44,77 $\pm$ 18,10	55,37 $\pm$ 30,37	66,69 $\pm$ 74,26

ND – não detectado. P < 0,05.

Tabela 2. Concentração médias (uM) de ácidos orgânicos no líquido intra-vesicular extraído dos cisticercos por cisticercos de *Taenia crassiceps* presentes no meio de cultura (RPMI) expostos in vitro a diferentes concentrações de niclosamida.

	Controle	Niclosamida 1uM	Niclosamida 2uM	Niclosamida 3uM
Oxaloacetato	39,43±29,37	29,14±20,47	35,09±36,89	50,92±36,37
Citrato	99,95±64,83	171,61±140,49	197,34±211,67	-
α-cetoglutarato	12,60±2,81	10,18±4,37	11,93±9,08	17,48±5,31
Piruvato	35,06±21,40	23,24±16,00	21,05±14,27	22,58±18,02
Malato	477,61±255,23	424,35±449,06	339,31±220,48	353,01±183,82
Succinato	1850,03±566,75	2044,098±1515,9	2015,08±1061,37	1785,06±918,45
Lactato	ND	ND	ND	ND
β-hidroxitirato	ND	ND	ND	ND
Acetoacetato	304,92±169,35	336,56±277,61	8669,02±20688,69	332,19±217,29
Acetato	ND	ND	ND	ND
Fumarato	146,83±86,83	186,80±139,20	198,40±150,07	181,39±122,89
Propionato	ND	ND	ND	ND

ND –não detectado. P>0,05.

## 10. CONCLUSÕES

---

Houve a detecção e quantificação *in vitro* dos ácidos orgânicos relativos ao metabolismo da via da glicólise aeróbia e anaeróbia (piruvato e lactato, respectivamente), do ciclo do ácido tricarboxílico (oxaloacetato, citrato,  $\alpha$ -cetogluturato, succinato, fumarato e malato) e da oxidação de ácidos graxos (acetato, acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e propionato) na fase larval do cisticerco de *T. crassiceps* (ORF) após o tratamento com dosagens subletais de niclosamida.

Quanto às análises dos resultados obtidos pode-se evidenciar a influência negativa, ou seja, diminuindo a média das concentrações da Secreção/Excreção dos grupos tratados em comparação dos grupos controles, sobre a excreção de lactato e uma interferência sobre o succinato positiva, ou seja, um aumento das médias das concentrações da Secreção/Excreção dos grupos tratados em relação aos controles, levando-o a excreção. Isso demonstra uma preferência do estágio larval do cisticerco de *T. crassiceps* pelo metabolismo aeróbio de produção de energia quando em meio tratado com niclosamida, fármaco com ação maior sobre o metabolismo anaeróbio.

## **11. RECOMENDAÇÕES**

---

A de se considerar pelos resultados obtidos a necessidade de se realizar mais análises complementares, como por exemplo, para detecção das concentrações de glicose e até mesmo de substratos ligados a outras vias de metabolismo como o de proteínas.

Evidenciam-se também pelos dados obtidos que os desvios-padrão das médias das concentrações dos ácidos orgânicos detectados estão com uma amplitude considerável, isso pode ser resolvido aumentando-se o número amostral. Além disso, pode-se usar no lugar do desvio-padrão o intervalo de confiança, que é preferível para relatar uma estimativa e sua medida de precisão.

## 12. REFERÊNCIAS

---

- Arenal IP del, Flores AG, Poole RK, Escamilla JE. *Taenia crassiceps* metacestodes have cytochrome oxidase aa3 but not cytochrome o functioning as terminal oxidase. *Mol Biochem Parasitol* 114: 103–109, 2001.
- Arocker-Mettinger E, Huber-Spitzy V, Auer H, Grabner G, Stur M. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye: A case report. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 201(1): 34-37. 1992.
- Bezerra JCB, Kemper A, Becker W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 779–784, 1999.
- Biondi GF, Mucciolo RG, Nunes CM, Richtzenhain LJ. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. *Vet Parasitol* 64: 261–6, 1996.
- Brett AMO, Da Silva LA, Fujii H, Mataka S, Thiemann T. Detection of the damage caused to DNA by a thiophene-S-oxide using an electrochemical DNA-biosensor. *J Electroanal Chem* 549: 91–99, 2003.
- Chermette R, Bussi eras J, Marionneau J, Boyer E, Roubin C, Prophette B, Maillard H, Fabiani B. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. *Bull Acad Natl Med* 179: 777–80; discussion 780–3, 1995.
- Corbin I, Simcoff R, Novak M, Blackburn BJ. Metabolism of [3-(13)C]-pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 84: 516–8, 1998.
- Del Arenal IP, Rubio ME, Ramírez J, Rendon JL, Escamilla JE. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. *Parasitol Int.* 54:185-193, 2005.
- Del Arenal, IP, Flores AG, Poole RK, Escamilla JE. *Taenia crassiceps* metacestodes have cytochrome oxidase aa3 but not cytochrome o functioning as thermal oxidase. *Mol Biochem Parasitol.* 114:103-109, 2001.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21:659–67, 2008.
- DrugBank, open data Drug e Drug target database. Estrutura química da Niclosamide (DB06803). Disponível em <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06803>. Acessado em 07/02/2015.
- DrugBank, open data Drug e Drug target database. Estrutura química do Albendazol (DB00518). Disponível em: <http://moldb.wishartlab.com/molecules/DB00518/image.png>. Acessado em: 30/03/2015.

DrugBank, open data Drug e Drug target database. Estrutura química do Dinitrofenol (DB04528). Disponível em: <http://moldb.wishartlab.com/molecules/DB04528/image.png>. Acessado em: 09/04/2015.

Esch GW, Smyth JD. Studies on the *in vitro* culture of *Taenia crassiceps*. Int J Parasitol 6: 143–149, 1976.

Espíndola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, Vaz a J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. Veterinary parasitology 89: 321–6, 2000.

Espíndola NM, Vaz AJ, Pardini AX, Fernandes I. Excretory/secretory antigens (ES) from *in vitro* cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. Ann Trop Med Parasitol 96(4): 361–368, 2002.

Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer D A. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. J Parasitol 90: 79–84, 2004.

Fenner A. Prostate cancer: Niclosamide jumps the hurdle of enzalutamide resistance. Nat Rev Urol 11: 424, 2014.

Flisser A, Vargas-parada L, Laclette JP. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita (INVESTIGACION Y CIENCIA). Divulgación de las Ciencias Genómicas (UNAM). 2006. Disponível em: <http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/panel/4/taenia-solium-un-par%C3%A1sito-cosmopolita-investigacion-y-ciencia>. PDF. Acesso em 03/03/2014.

Fraga CM, Costa TL, Bezerra JCB, de Souza Lino Junior R, Vinaud MC. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with anthelmintic drugs. Exp Parasitol 131: 111–5, 2012a.

Fraga CM, Costa TL, Bezerra JCB, de Souza Lino R, Vinaud MC. *Taenia crassiceps*: host treatment alters glycolysis and tricarboxilic acid cycle in cysticerci. Exp Parasitol 130: 146–51, 2012b.

Fraga CM, Costa TL, Bezerra JCB, De Souza Lino R, Vinaud MC. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxilic acid cycle in cysticerci. Exp Parasitol 130: 146–151, 2012c.

François A, Favennec LP, Cambon-Michot C, Gueit I, Biga N, Tron F, Brasseur P, Hemet J. *Taenia crassiceps* Invasive Cysticercosis: A New Human Pathogen in Acquired Immunodeficiency Syndrome? Am Jour Surg Pathol 22(4): 488-492, 1998.

Frayha GJ, Smyth JD, Gobert JG, Savel J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. Gen Pharmacol 28: 273–99, 1997.

Freeman RS. Studies on the Biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Can J Zool 40: 969–990, 1962.

Haque A, Hollister WS, Willcox A, Canning EU. The antimicrosporidial activity of albendazole. J Invertebr Pathol 62:171–7, 1993.

- Heldwein K, Biedermann H, Hamperl W, Bretzel, G, Löscher, T, Laregina, D, Frosch, M, Büttner, DW, Tappe, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg* 75:108–11, 2006.
- Hoberg EP, Jones A, Rausch RL, Eom, KS, Gardner, SL. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). *J Parasitol* 86:89–98, 2000.
- Hoberg EP. Phylogeny of *Taenia*: Species definitions and origins of human parasites. *Parasitol Int* 55 Suppl: S23–30, 2006.
- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King, CH, Pearce, EJ, Jacobson, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118:1311–21. 2008.
- James DM, Gilles HM. Human Antiparasitic Drugs In: Pharmacology and Usage. John Wiley & Sons, New York. 1985.
- Jenkins DJ, Romig T, Thompson, RC a. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *Int J Parasitol* 35: 1205–19, 2005.
- Jia W-Z, Yan, H-B, Guo, A-J, Zhu, X-Q, Wang, Y-C, Shi, W-G, Chen, H-T, Zhan, F, Zhang, S-H, Fu, B-Q, Littlewood, DTJ, Cai, X-P. Complete mitochondrial genomes of *Taenia multiceps*, *T. hydatigena* and *T. pisiformis*: additional molecular markers for a tapeworm genus of human and animal health significance. *BMC genomics* 11: 447, 2010.
- King ML, Lindberg ME, Stodden GR, Okuda H, Ebers SD, Johnson A, Montag A, Lengyel E, MacLean Li JA, Hayashi K. WNT7A/ $\beta$ -catenin signaling induces FGF1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer. *Oncogene*. Sep 1, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2014277a.html>. Acessado em: 06/02/2015.
- Köhler P, Voigt WP. Nutrition and Metabolism. In: Melhorn H. Parasitology in focus: facts and trends, Springer-Verlag, Berlim (Alemanha). 1988.
- Komuniecki R, Tielens AGM. Carbohydrate and energy metabolism in parasitic helminths In: Molecular Medical Parasitology. Elsevier Science Ltd. 2003.
- Krátký M, Vinšová J, 2011. Antiviral activity of substituted salicylanilides--a review. *Mini Rev Med Chem* 11: 956–67, 2011.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Scitutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 114: 926–8, 1990.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica, 4ª ed., Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo. 2006.
- Li Y, Li P-K, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Lett* 349: 8–14, 2014.
- Liu C, Lou W, Zhu Y, Nadiminty N, Schwartz CT, Evans CP, Gao AC. Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 20: 3198–210, 2014.

- Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Celerier P. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. *AIDS* 12: 1551-1552, 1998.
- Murrell KD, Dorny P, Flisser A, Geerts S, Kyvsgaard NC, McManus D, Nash T, Pawlowski. WHO / FAO / OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis / cysticercosis. Copyright. Paris, 2005.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . html. Acessado em 12/12/2014.
- Ntoukas V, Tappe D, Pfütze D, Simon M, Holzmann T. Cerebellar cysticercosis caused by larval *Taenia crassiceps* tapeworm in immunocompetent woman, Germany. *Emerg Infect Dis* 19: 2008–2011, 2013.
- Oxberry ME, Reynoldson J a, Thompson RC. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *J Vet Pharmacol Ther* 23:113–20, 2000
- Pan J-X, Ding K, Wang C-Y 2012. Review Niclosamide Inhibits Tumor Cell Growth Niclosamide inhibits the proliferation of tumor cells with minimal effect on normal cells. *Chin J Cancer* 31: 178–184. 2012.
- Philip J R. “Chapter 53. Clinical Pharmacology of the Antihelminthic Drugs” (Chapter) In: Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*, 15e. 2015. Disponível em <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=4516635>. Acessado em 22/01/2015.
- Ramírez T, Benítez-Bribiesca L, Ostrosky-Wegman P, Herrera L a. *In vitro* effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Arch Med Res* 32:119–22, 2001
- Rey, L. Tênia e teníases. In: *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais*. 4.ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2008a.
- Sciutto E, Frago G, Manoutcharian K, Gevorkian G, Rosas-Salgado G, Hernández-Gonzalez M, Herrera-Estrella L, Cabrera-Ponce J, López-Casillas F, González-Bonilla C, Santiago-Machuca A, Ruíz-Pérez F, Sánchez J, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res* 33: 371–8, 2002.
- Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res* 89: 77-78, 2003.
- Takayanagui OM, Odashima NS. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitol Int* 55 Suppl: S111–5, 2006.
- Thompson RC a. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol* 119: 439–46, 2008.
- Tielens a GM. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol Today* 10: 346–352, 1994.
- Toledo A, Frago G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 69(3): 1766–1773, 2001.

- Tomlin CDS (ed.). The Pesticide Manual - World Compendium. 10th ed. Surrey, UK: The British Crop Protection Council, p. 732, 1994.
- Vaz AJ, Numes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 354-357, 1997.
- Verster, A. A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus, str. *Onderstepoort J Vet Res* 1969; 36:3-5. 1758 s.
- Vianna LG, Macedo V, Costa JM, 1991. Cisticercose músculo-cutânea e visceral - doença rara? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33: 129-136, 1991.
- Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior RDS, Bezerra JCB. *Taenia crassiceps*: energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Exp Parasitol* 120: 221-6, 2008.
- Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior RDS, Bezerra JCB. *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Exp Parasitol* 122: 208-11, 2009.
- Vinaud MC, Lino RDS, Bezerra JCB. *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Exp Parasitol* 116: 335-9, 2007.
- Weinbach EC, Garbus J. Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature* 221:1016-1018, 1969.
- Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 137: 335-46, 2010.
- Zenka J, Prokopic J. Contribution to the knowledge of aerobic processes in *Taenia crassiceps* larvae (Zeder, 1800). *Folia Parasitol (Praha)* 33: 331-6, 1985.

## 13. ANEXOS

---

### 13.1. Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

#### Notificação de Aprovação de Projeto - CEUA/PRPPG/UFG

1 mensagem

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA <ceua.ufg@gmail.com>

14 de fevereiro de 2014 11:24

Para: Marina Vinaud <marinavinaud@gmail.com>

Prezado(a) Pesquisador(a) Marina Clare Vinaud,

Comunicamos que o projeto inscrito sob **Protocolo n. 050/13**, intitulado *Neurocisticercose experimental: alterações morfológicas e bioquímicas causadas pela ação de nitazoxanida e niclosamida*, foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG.

Reiteramos a importância desse Parecer substanciado e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG um Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA.

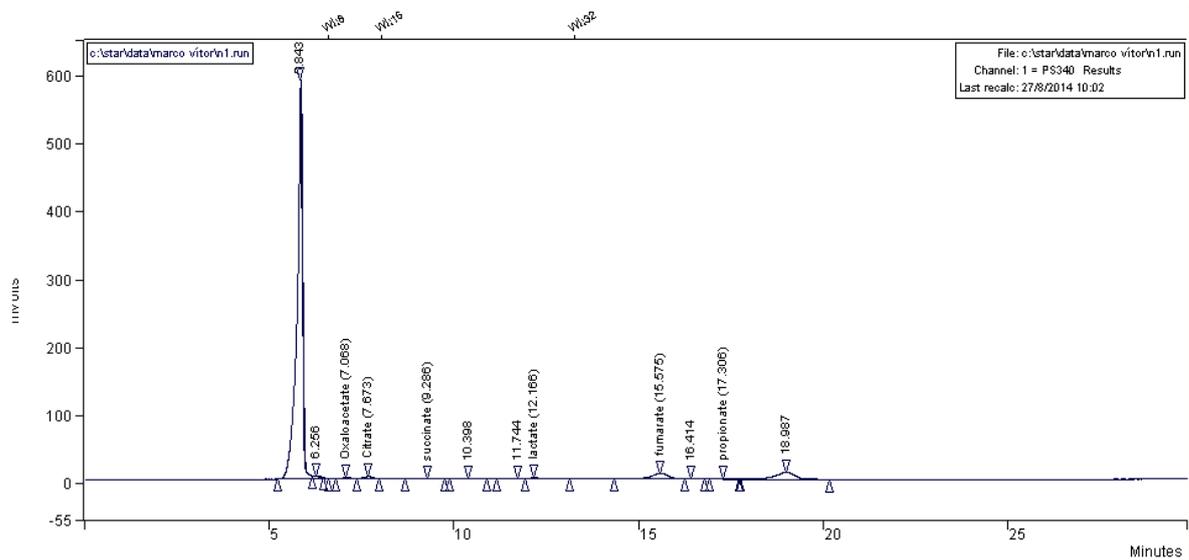
Atenciosamente,

--

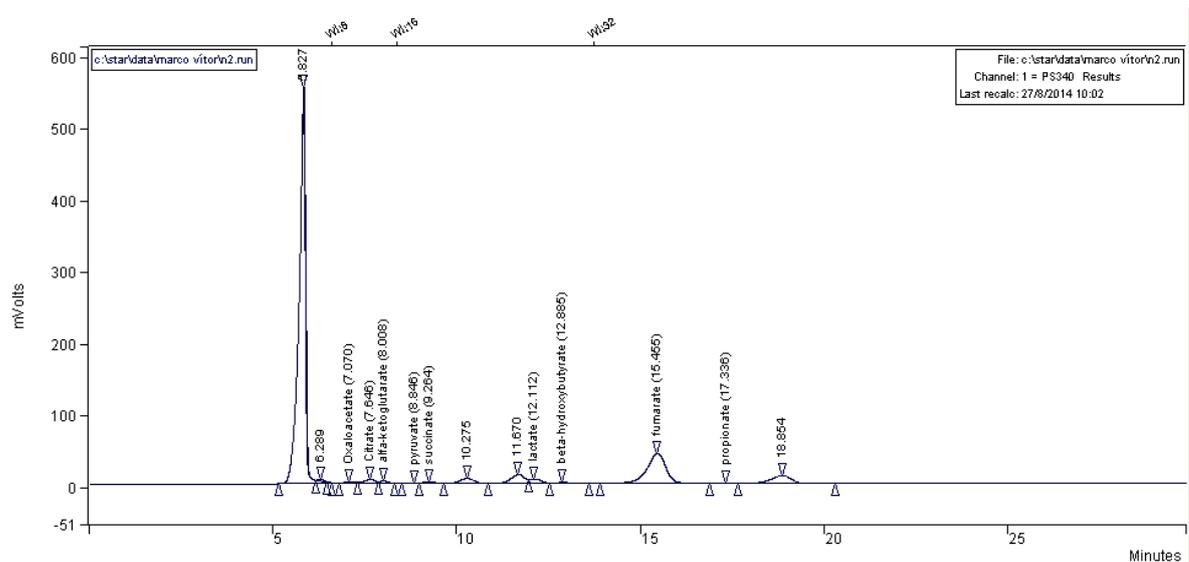
.....  
**Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG  
Universidade Federal de Goiás/UFG  
(62)3521-1215

TCLE. Parecer do Comitê de Ética

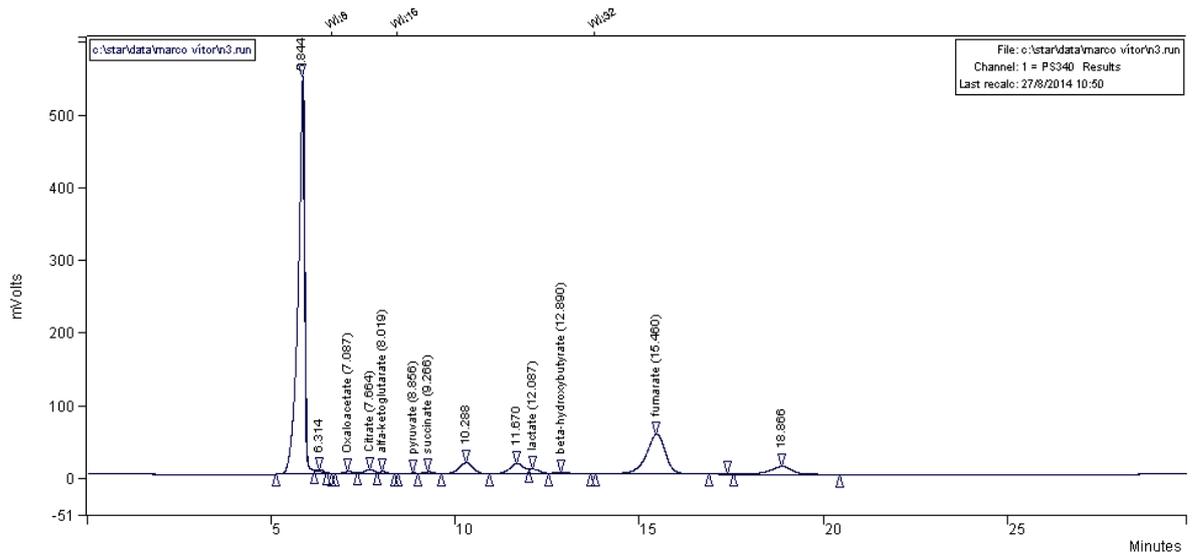
## 13.2. Anexo 2 - Cromatogramas



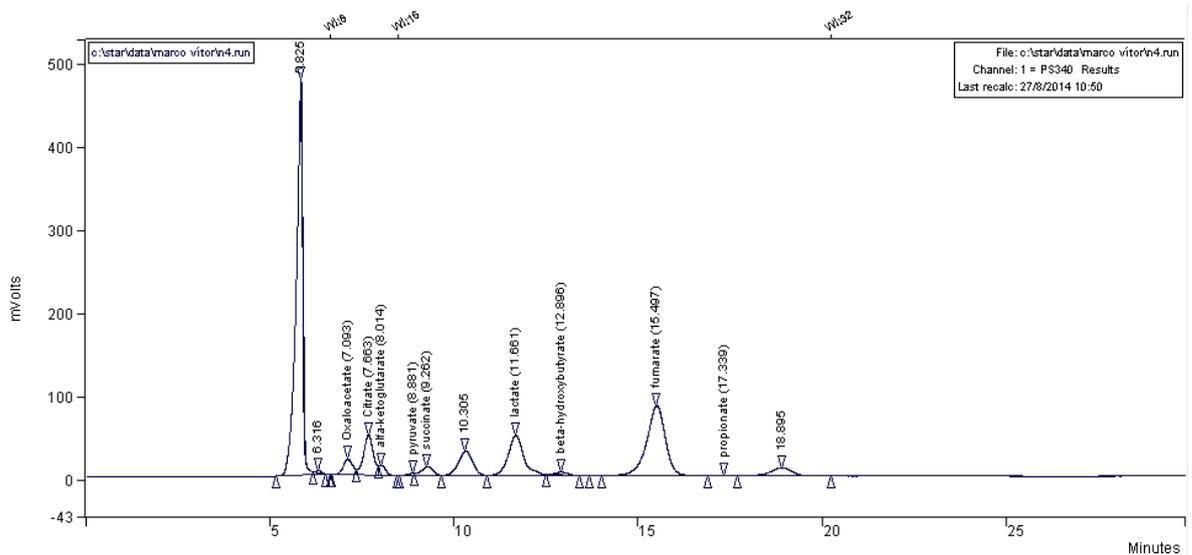
Cromatograma 1. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 1 (somente RPMI)



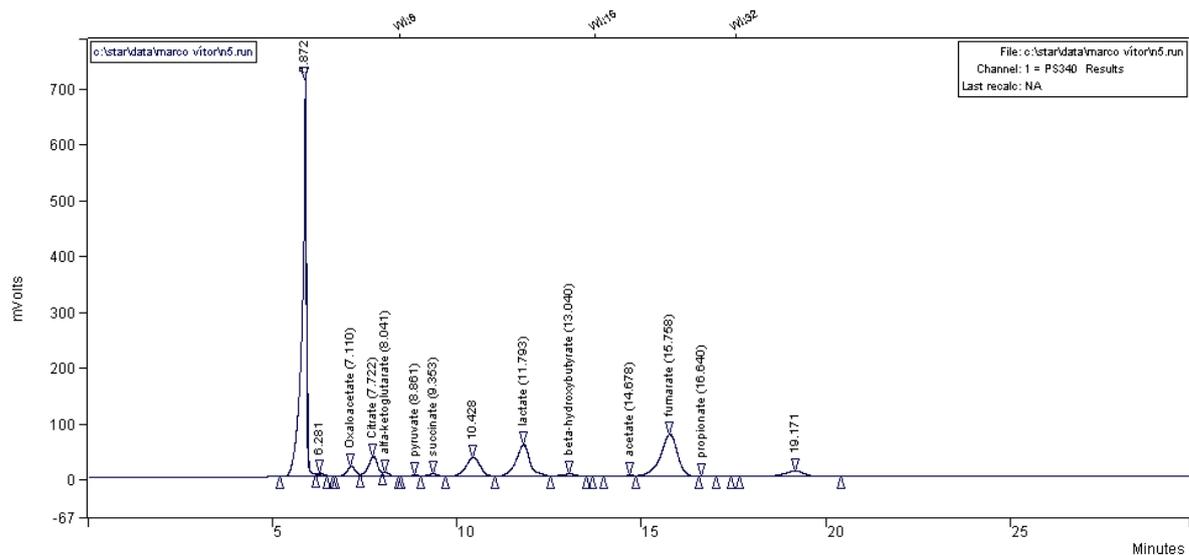
Cromatograma 2. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 2 (Meio de cultura RPMI e cisticercos)



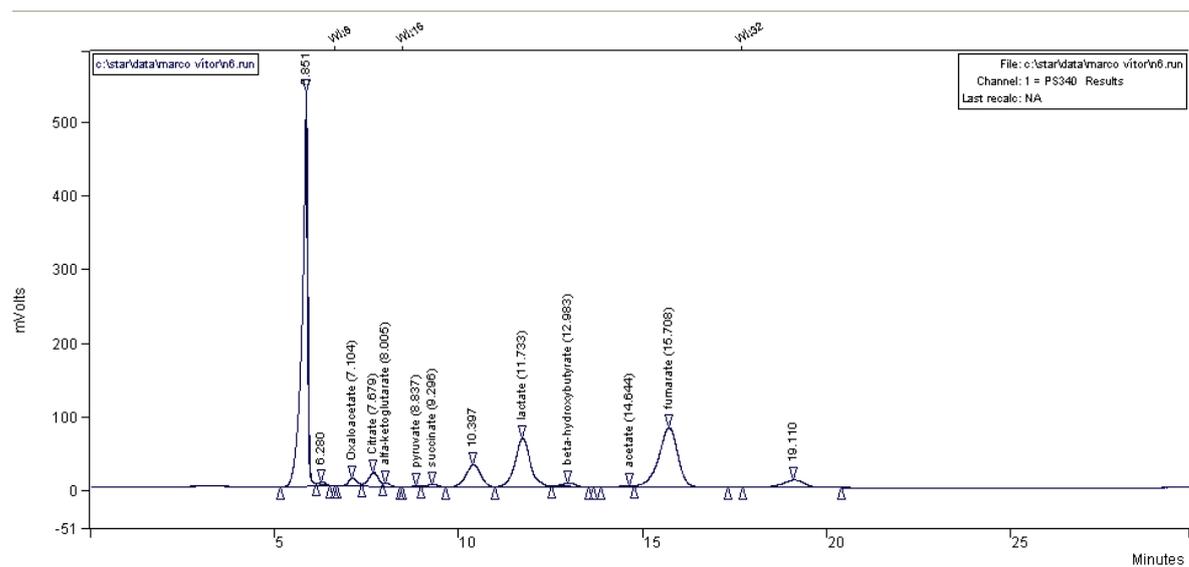
Cromatograma 3. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo controle 3 (Meio de cultura RPMI, cisticerco e etanol)



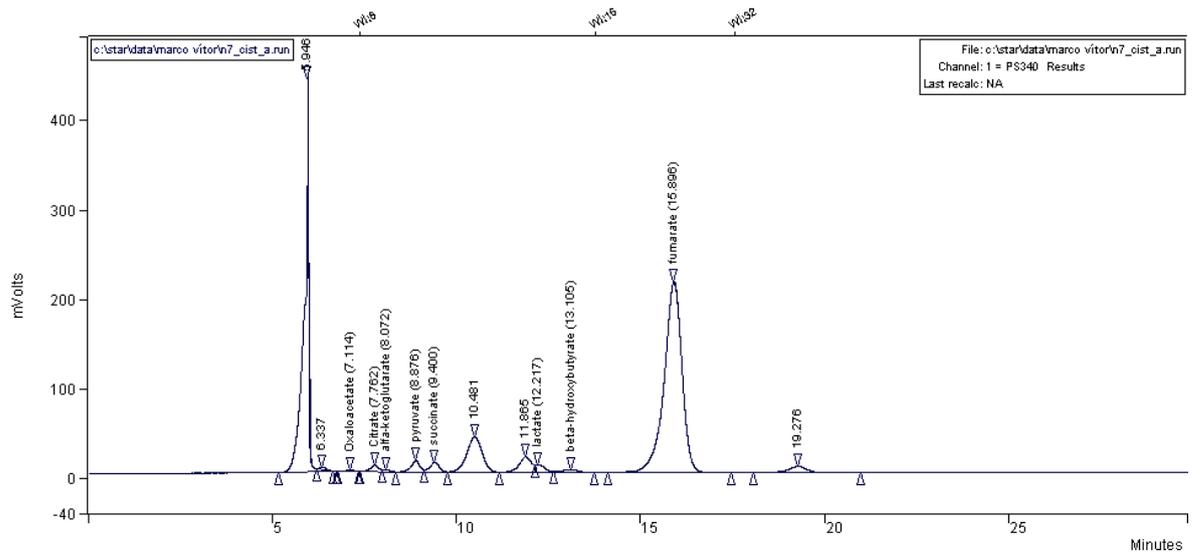
Cromatograma 4. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 3 uM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 3 uM de Niclosamida)



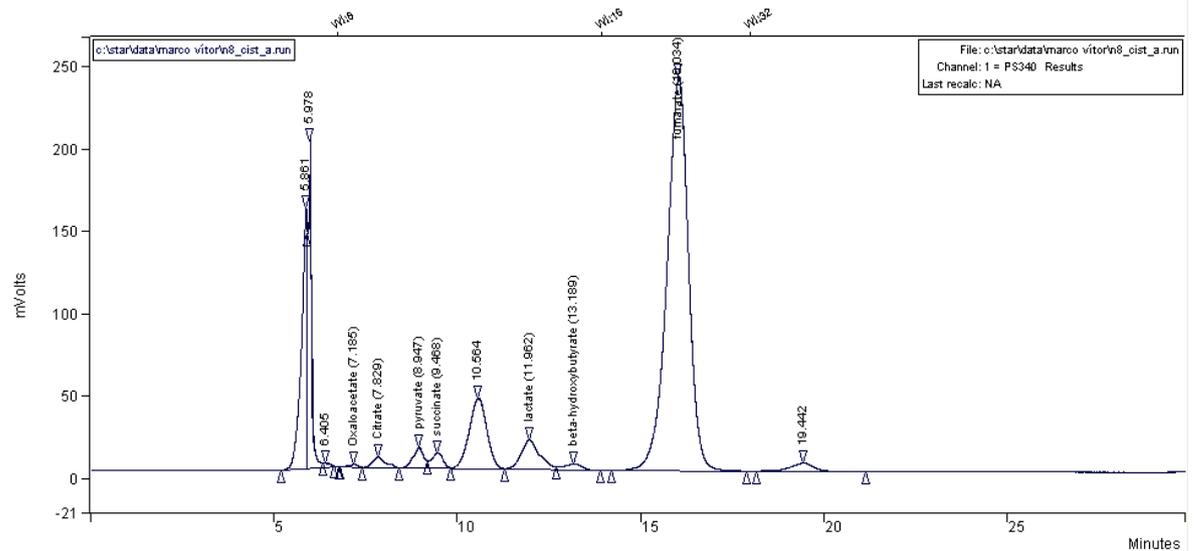
Cromatograma 5. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 2 μM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 2 μM de Niclosamida)



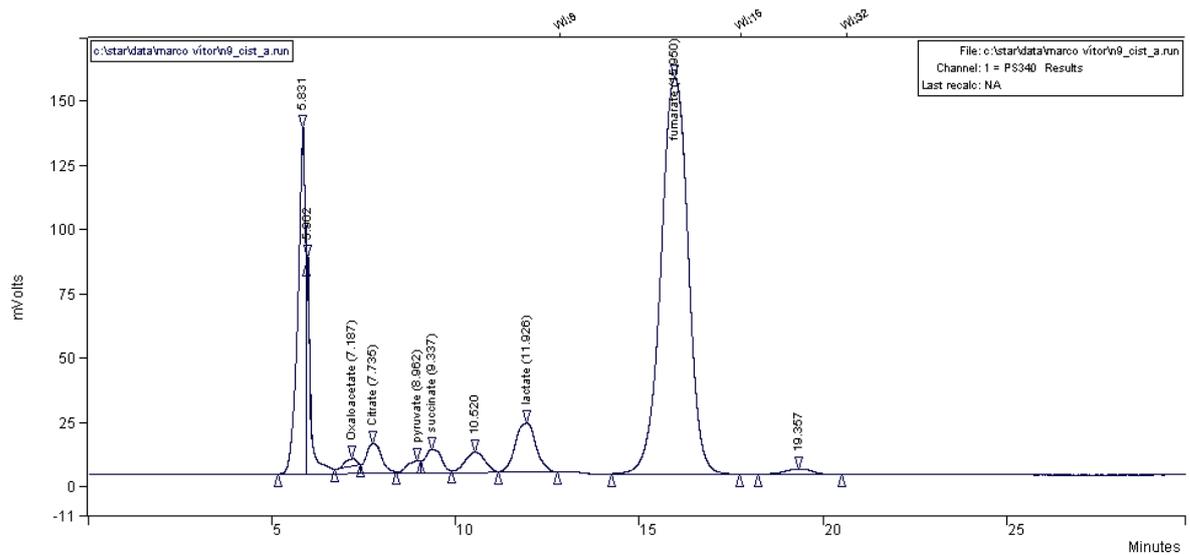
Cromatograma 6. Detecção in vitro de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos em estágio larval do grupo com 1 μM de Niclosamida (Meio de cultura RPMI, cisticerco e 1 μM de Niclosamida)



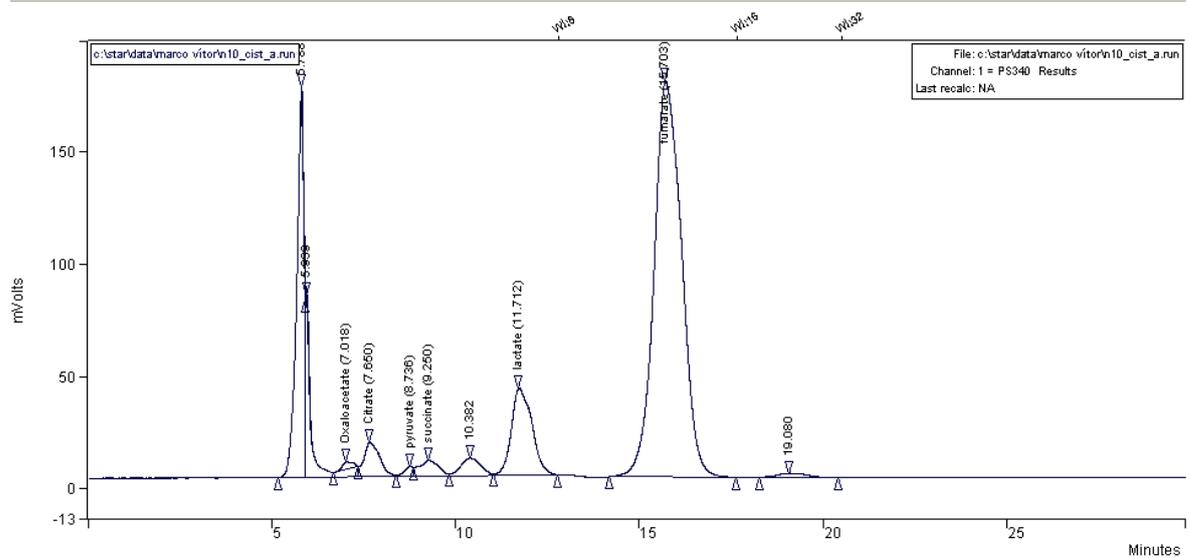
Cromatograma 7. Detecção in vitro de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo controle 2 (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI).



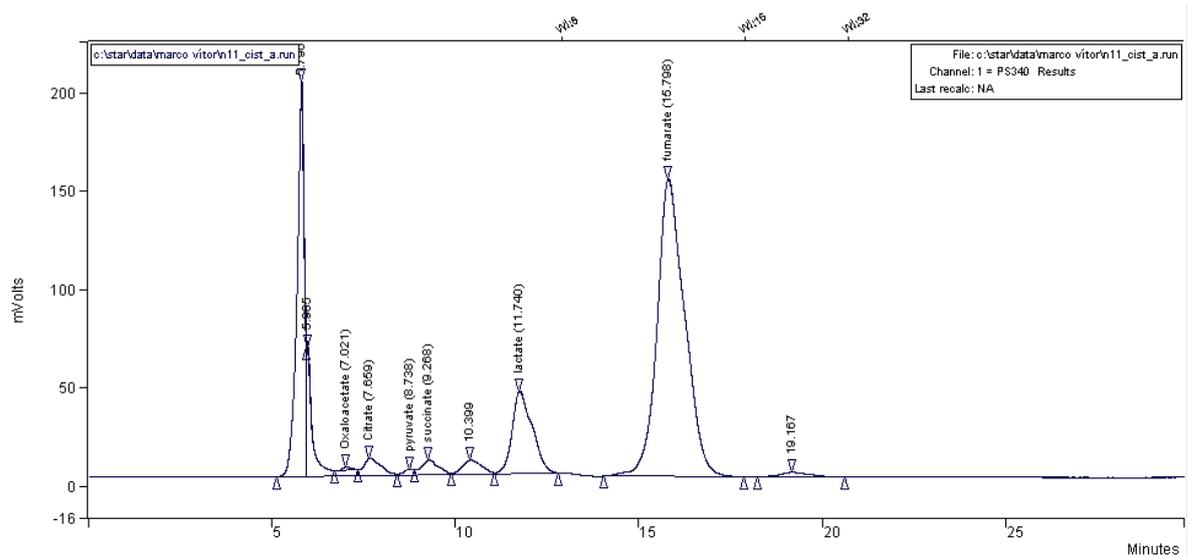
Cromatograma 8. Detecção in vitro de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo controle 3 (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e etanol)



Cromatograma 9. Detecção in vitro de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 3 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 3 uM de Niclosamida)



Cromatograma 10. Detecção in vitro de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 2 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 2 uM de Niclosamida)



Cromatograma 11. Detecção in vitro de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos em estágio larval do grupo com 1 uM de Niclosamida (Cisticerco processado cultivado anteriormente em meio RPMI e 2 uM de Niclosamida)