



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA

VÂNIA BEATRIZ LOPES

Lesão tecidual e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental

Goiânia, 2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES EDISSERTAÇÕES 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):	Vânia Beatriz Lopes				
E-mail:	Vaniabeatriz2000@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor	Não				
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq		
País:	Brasil	UF:		CNPJ:	
Título:	Lesão tecidual e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental				
Palavras-chave:	neurocisticercose experimental, resposta imune, citocinas, lesão tecidual, desmielinização periventricular, desmielinização parenquimal, <i>Taenia crassiceps</i>				
Título em outra língua:	Tissue injury and cytokine profile in the experimental neurocysticercosis				
Palavras-chave em outra língua:	experimental neurocysticercosis, immune response, tissue injury, demyelination periventricular, parenchymal demyelination, <i>Taenia crassiceps</i>				
Área de concentração:	Patologia				
Data defesa:(dd/mm/aaaa)	09/11/2015				
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador (a):	Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior				
E-mail:	ruylino@yahoo.com.br (RS Lino Jr.)				
Co-orientador (a):*	Prof.ª Dr.ª Marina Clare Vinaud e Prof.ª Dr.ª Patrícia Resende Alo Nagib Loyola				
E-mail:	marinavinaud@gmail.com (Marina Vinaud) pnagib@gmail.com (Patrícia Nagib Loyola)				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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.

Assinatura do(a) autor(a) _____

Data: 25/11/2015

¹Neste 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.

VÂNIA BEATRIZ LOPES

Lesão tecidual e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical e Saúde Pública da
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título de Doutor em
Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza
Lino Júnior

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marina
Clare Vinaud e

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia
Resende Alo Nagib Loyola

Goiânia, 2015

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

Lopes, Vânia Beatriz

Lesão tecidual e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental
[manuscrito] : Neurocisticercose Experimental / Vânia Beatriz Lopes. -
2015.

XIV, 85 f.: il.

Orientador: Prof. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino-Jr; co-orientador Prof.^a
Dr.^a Marina Clare Vinaud; co-orientador Prof.^a Dr.^a Patrícia Resende
Alo Nagib Loyola.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

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

1. neurocisticercose experimental, , . 2. resposta imune
desmielinização . 3. lesão tecidual. 4. desmielinização . 5. Taenia
crassiceps. I. Lino-Jr, Prof. Dr. Ruy de Souza, orient. II. Clare Vinaud,
Prof.^a Dr.^a Marina , co-orient. III. Título.

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Vânia Beatriz Lopes

Orientador (a): Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Marina Clare Vinaud e Prof.^a Dr.^a Patrícia Resende Alo Nagib Loyola

Membros:

1. Prof.^a Dr.^a Juliana Reis Machado e Silva

2. Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Giomarães Faleiros

3. . Prof.^a Dr.^a Aline Priscila Pansani

4. Prof.Dr. João Alves de Araújo Filho

5. Dr. Diego Basile colugnati

6. Prof.^a Dr.^a Fernanda Cristina de Alcântara dos Santos

Data: 09/ 11/ 2015

**Viver é acalantar sonhos e esperanças,
Fazendo da fé a nossa inspiração maior.
É buscar nas pequenas coisas,
Um grande motivo para ser feliz!**
Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado luz no fim do túnel, me iluminando, guiando e fortalecendo durante toda essa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, pela credibilidade e confiança em mim depositadas e posteriormente pela paciência, dedicação ensinamentos, conselhos e orientações me encorajando a trilhar novos caminhos e preservar sempre. Antes de orientador, um grande amigo.

As minhas co-orientadoras Dr^a Marina Vinaud, pela amizade, apoio, confiança e dedicação, e a Prof.^a Dr.^a Patrícia Loyola, pela contribuição científica para a realização deste trabalho.

A minha querida família, em especial ao meu pai Hélio *in memoriam*, e minha mãe sempre presente com palavras de incentivo e coragem, aos meus filhos, Priscila, Stéphanie e Paulo Jr, por todos os momentos vividos juntos, como também pela força e apoio emocional. A minha querida irmã Valéria pelas correções gramaticais deste trabalho, e pelas palavras de incentivo e apoio em qualquer desafio que escolheste a trilhar.

Ao querido Valdir pelo incentivo e paciência de todas as horas.

A minha querida amiga Sarah, pelos bons e difíceis momentos vividos e pelas palavras confortantes nas horas difíceis sabendo alegrar minha alma.

Aos professores da Patologia Liliana, Flávia, Ruy, Mara, Marina e Raul Chavarria pela força e apoio nos momentos difíceis. Em especial a Prof^a Juliana pelas horas de apoio e dedicação na padronização de técnicas.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por ter aberto as portas do seu laboratório que tornou possível a realização de algumas técnicas requerida no desenvolvimento desta pesquisa, como também pelo apoio tecnológico.

Aos meus amigos do laboratório de Patologia, Sarah, Marcelo, Íria, Hidelberto, Renato, Diego, Alexandre, Júlia, Amanda, Anália e Vera pelo companheirismo e amizade.

Ao Laboratório de Citocinas especialmente aos colegas Clayson, Lucilla, Lohane, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários e colegas do Biotério do IPTSP/UFG, Marco Vítor, Iraci, Marly, Gilda e Raimundo, pela convivência e motivação.

A todos os professores da Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG, pela enorme contribuição para o meu conhecimento científico.

Ao Programa de Pós-Graduação e Medicina Tropical e Saúde Pública pela contribuição científica e metodológica.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, que viabilizou a realização deste projeto como também o crescimento profissional de cada aluno.

Aos funcionários do IPTSP/UFG Kariny, José Clementino, Fernando, Valéria, Alencar e Divina, pela atenção e competência.

A todos os funcionários da limpeza do IPTSP/UFG por sempre manter nosso ambiente de trabalho limpo e agradável.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	x
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. Ciclo biológico e modo de transmissão da cisticercose humana	2
1.2. Cisticercose humana	3
1.3 Patologia da NCC:	6
1.4 Inflamação e neurodegeneração na NCC:	8
1.5 Desmielinização na NCC:.....	13
1.6 Aspectos Gerais da <i>Taenia crassiceps</i> :.....	16
1.7 Modelo experimental de NCC:	18
1.8 Imunopatologia da Cisticercose Experimental por <i>T. crassiceps</i>	19
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
4 MÉTODOS	25
ARTIGOS 1– aceito pela Revista Parasitology.Resposta Imune Celular na NCC intraventricular experimental.....	30
ARTIGO 2 – Desmielinização na NCC Intraventricular Experimental	57
DISCUSSÃO GERAL DA TESE.....	69
7 CONCLUSÕES	73
8 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	82
Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética	
Anexo 2 - Aceite da revista Parasitology	

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Ciclo biológico da <i>Tania solium</i> e <i>Taenia saginata</i>	5
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Taenia crassiceps</i>	17
Figura 3: Resposta Imune inata e adaptativa provocada pelos cisticercos	22

LISTA DE FIGURAS NO ARTIGO 1:

Figura 1: Fotomicrografia dos ventrículos encefálicos de camundongos BALB/c infectados ou não com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> corados por HE-----	39
Figura 2: Quantificação de citocinas in situ em camundongo BALB/c infectados ou não com cisticercos viáveis de <i>Taenia crassiceps</i>	40
Figura 3: Análise sistêmica de citocinas na cultura de células do baço de camundongo BALB/c infectados ou não com cisticercos viáveis de <i>Taenia crassiceps</i>	41

LISTA DE FIGURAS NO ARTIGO 2:

Tabela 1. Análise dos processos patológicos gerais presentes no encéfalo de camundongos da linhagem BALB/c fêmeas infectadas ou não com cisticercos viáveis de <i>Taenia crassiceps</i>	59
Tabela 2. Análise da desmielinização nos encéfalos de camundongos BALB/c fêmeas infectadas intracranialmente com cisticercos viáveis de <i>Taenia crassiceps</i> ..	60
Figura 1. Fotomicrografia dos encéfalos de animais infectados ou não com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	61
Figura 2. Fotomicrografia dos encéfalos de animais infectados ou não com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> intraventricular.....	62

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - graus Celsius
μL - Microlitro
μm – Micrômetro
BHE – Barreira Hematoencefálica
CA1 - Corno de Ammon 1
CA2 -Corno de Ammon 2
CA3 - Corno de Ammon 3
CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais
Cm - Centímetros
DAI - Dias após o inóculo
DAMP - (do inglês, Damage Associated Molecular Pattern Molecules)
Padrões Moleculares associados ao dano tecidual
DCs - do inglês, Dendritic cells(Células Dendríticas)
DO - Densidade Ótica
ELISA - Ensaio Imunoenzimático (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
Fc - Fração cristalizável do anticorpo, que se liga aos receptores
HE - Hematoxilina e eosina
IFN γ - Interferon gama
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
M - Molar
M1 - Macrófagos classicamente ativados
M2 - Macrófagos alternativamente ativados
MHC-II -Molécula de Histocompatibilidade Principal classe II(Major Histocompatibility Complex)
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mM - Micromolar
MN - Células Mononucleares
N - Normal
NCC - Neurocisticercose
nm - Nanômetro
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF – Ontario Research Facility
PAMP - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos- do inglês, Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfatos (do inglês, Phosphate Buffered Saline)
PMNs - Polimorfonucleares
RPMI - Meio de cultura desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute
SBF - Soro Bovino Fetal

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - São Paulo

STAT - Via de Sinalização STAT(do inglês, Signal Transducers and Activator of Transcription)

TA - Temperatura Ambiente

Th - Linfócitos T auxiliar (do inglês, T helper)

Th1 - Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês, T helper 1)

Th2 - Linfócito T auxiliar do tipo 2 (do inglês, T helper 2)

TGF β – Fator de transformação do crescimento beta, do inglês (Transforming growth factor beta)

TLR- receptores semelhantes ao Toll- do inglês toll-like receptors

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa - do inglês Tumor Necrosis Factor alpha

Tregs - Células T reguladoras

T $\gamma\delta$ - Linfócito T gama delta

UFG - Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A cisticercose é uma doença endêmica e é considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde. A neurocisticercose (NCC) é a forma mais frequente e grave da cisticercose, sendo responsável por mais de 50 mil mortes anuais. A utilização de modelos experimentais em pesquisa tem sido essencial para o avanço do conhecimento de diversas doenças, como no entendimento da fisiopatologia, da resposta imune e das relações parasito hospedeiro. O presente estudo objetivou a caracterização da resposta imune celular *in situ* e sistêmica, e o papel das células inflamatórias em desencadear alterações nos padrões de mielina. Para isto, utilizou-se um modelo experimental de NCC intraventricular para avaliar as concentrações de citocinas *in situ* e sistemicamente, pela cultura de células do baço, e as alterações nos padrões de desmielinização periventricular e parenquimal ao longo do período experimental. Não foram detectadas alterações nas concentrações de citocinas no local da infecção. Sistemicamente, observa-se a presença de IL-10 inicialmente e aos 30 dias de infecção, observa-se a presença significativa de todas as citocinas analisadas como, IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ no grupo infectado. No final da infecção, o perfil Th2, foi predominante. Na avaliação anatomopatológica observou-se quebra da barreira hemato encefálica (BHE), que permitiu o influxo inicial de células inflamatórias nos dois grupos analisados. Aos 30 dias, observou-se processo inflamatório misto, ventriculomegalia, macrófagos espumosos e desmielinização periventricular. No final da infecção, predomínio de células mononucleares, ventriculomegalia, macrófagos espumosos e desmielinização no parênquima em sua maioria. Em conclusão, a resposta imune sistêmica dos camundongos BALB/c induzida por cisticercos de *T. crassiceps*, foi caracterizada por um perfil imune do tipo Th2e desmielinização parenquimal no final da infecção possivelmente pelo processo inflamatório como também pelo efeito compressivo do parasito sobre o parênquima encefálico.

Palavras-chave: neurocisticercose experimental, resposta imune, citocinas, lesão tecidual, desmielinização periventricular, desmielinização parenquimal, *Taenia crassiceps*

ABSTRACT

The cysticercosis is endemic and is considered neglected by the World Health Organization. The neurocysticercosis (NCC) is the most common and severe form of cysticercosis, accounting for over 50,000 deaths annually. The use of experimental models in research, has been essential to the advancement of knowledge of various diseases, such as in understanding the pathophysiology, immune response and parasite host reactions. This study aimed to characterize the cellular immune response in situ and systemic, and the role of inflammatory cells in triggering changes in myelin standards. For this, we used an experimental model to evaluate the NCC intraventricular concentrations of cytokine in situ and systemically, by spleen cell culture, and changes in parenchymal patterns and periventricular desmielinização throughout the experimental period. No changes were detected in cytokine concentration at the infection site. Systemically, it is observed the presence of IL-10 initially and after 30 days of infection, there is a significant presence of all the cytokines analyzed as IL-4, IL-10, IL-17 and IFN- γ in the infected group. At the end of the infection, the Th2 profile was predominant. In evaluating pathological observed breaking the blood-brain barrier (BBB) allowing the initial influx of inflammatory cells in the two groups. At 30 days, there was a mixed inflammatory process, ventriculomegaly, foamy macrophages and periventricular desmielinização. At the end of the infection, predominance of mononuclear cells, ventriculomegaly, foamy macrophages and demyelination in the parenchyma mostly. In conclusion, the systemic immune response of BALB / c mice induced by cysticercus *T. crassiceps*, was characterized by a Th2-type immune profile and desmielinização parenchymal infection possibly at the end of the inflammatory process as well as the compressive effect on the parenchyma of the parasite brain.

Keywords: experimental neurocysticercosis, immune response, tissue injury, demyelination periventricular, parenchymal demyelination, *Taenia crassiceps*

INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

Os conhecimentos acerca da cisticercose foram inicialmente datados da antiguidade, por Aristóteles, ficando estagnados até a segunda metade do século XIX, quando pesquisadores alemães demonstraram que a forma larvária da *Taenia solium* era responsável pelo desenvolvimento da cisticercose em animais e em humanos (DEL BRUTTO & SOTELO, 1988).

A cisticercose é uma doença endêmica em várias partes do mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008) como doença negligenciada. Estima-se que aproximadamente 50 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 50 mil morrem por cisticercose anualmente, sendo que 32 milhões de pessoas infectadas se encontram na África, 11 milhões na Ásia e 3 milhões nas Américas. Na América Latina cerca de 18 países apresentam casos de cisticercose, tais como: Argentina, Venezuela, México, Colômbia, Guatemala, Uruguai e Brasil (FLISSER, 1991; MMWR, 1992; WHO, 2008). A migração de pessoas entre as áreas vem mudando sua localização geográfica (PAL & CARPIO *et al.*, 2000).

A Neurocisticercose (NCC) é uma infecção do sistema nervoso central, causada pela forma larval da *Taenia solium*, a forma mais frequente da cisticercose (DE ALBUQUERQUE & GALHARDO, 1995, DEL BRUTTO & SOTELO 1988). É considerada a mais grave das infecções parasitárias do sistema nervoso humano, acometendo um grande número de pessoas, produzindo algumas vezes sintomatologia grave (FLISSER, 1991; COULDWELL & APUZZO 1992; FLISSER & PLANOARTE, 1991; SCHENONE *et al.*, 1982).

A frequência desta enfermidade no Brasil em autópsias varia de 0,12 a 9%, na clínica de 0,03 a 13,5% e nos estudos soro epidemiológicos de 0,68 a 6,2%. As áreas endêmicas estão compreendidas nos estados da região central do Brasil, além de São Paulo, Paraná, e Minas Gerais, devido às condições de criação das suinoculturas (AGAPEJEV, 2003; TAKAYANAGUI *et al* 1996). A principal faixa etária

acometida predomina entre 21 e 40 anos, embora tenham sido descritos casos de NCC em pessoas idosas (CAVELLANI *et al.*, 2007), possivelmente porque a cisticercose é uma doença onde os sintomas aparecerão tardiamente. O sexo masculino é o mais atingido, da zona rural em sua maioria, possivelmente pelos hábitos de higiene e trabalhar diretamente com os animais infectados. O quadro clínico mais preponderante é a epilepsia seguida de cefaléia e hipertensão intracraniana (AGAPEJEV, 2003). Estima-se que o Brasil gaste aproximadamente US\$85 milhões de dólares no tratamento de complicações da NCC (COSTA, 2003; PAL & CARPIO *et al.* 2000). Deste modo a NCC constitui um desafio importante para o sistema público de saúde do nosso país.

Ciclo biológico e modo de transmissão da cisticercose humana

Os cestódeos *Taenia solium* e *Taenia saginata* são responsáveis pela teníase humana. O gênero *Taenia* pertence à família *Taenidae*, à classe *Cestoidea* e à ordem *Cyclophyllidea* (REY, 1991). As formas larvais (*Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus bovis* respectivamente, denominação sem valor taxonômico) produzem a cisticercose. O ciclo das tênias implica dois hospedeiros, um definitivo e um intermediário, e uma fase de vida livre. O único hospedeiro definitivo de ambas as tênias (fase adulta do parasito) é o homem, em cujo intestino delgado se aloja. Os hospedeiros intermediários de *Taenia solium* são os suínos e os de *T. saginata* são os bovinos, desenvolvendo-se na musculatura (ACHA & SZYFRES, 1986; REY, 1991). Os parasitos classificam-se em três fases: adulto no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e cisticercos (fase larval) no hospedeiro intermediário (GEMMELL & LAWSON, 1989; GEMMELL *et al.*, 1983).

Quando os ovos de tênia são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os embriões (oncosferas) se libertam do ovo no intestino delgado pela ação dos sucos digestivos e bile. As oncosferas penetram no intestino e, em 24 a 72 horas, difundem-se no organismo através da circulação sanguínea. Ocorre então formação de cisticercos em diferentes tecidos do hospedeiro, como músculos esqueléticos e cardíaco (GEMMELL *et al.*, 1983), sistema nervoso central, dentre outros, gerando a cisticercose (FLISSER, 1991). Os cistos medem de 7 a 12mm de comprimento por 4 a 6mm de largura (REY, 1992).

Alguns autores relatam que a cisticercose humana por cisticercos de *T. saginata* é extremamente rara ou não ocorre, mas não há comprovação científica desse fato (ACHA & SZIFRES, 1986; SCHANTZ *et al.*, 1994; SCHENONE *et al.*, 1982), enquanto outros admitem a possibilidade de cisticercose humana por ambas as espécies de tênia (GEMMELL *et al.*, 1983; PAWLOWSKI & SCHULTZ, 1972; REY, 1973; REY, 1991).

Cisticercose humana

O complexo teníase-cisticercose(T/C) constitui um problema de saúde pública, em que o homem se comporta como hospedeiro definitivo e hospedeiro intermediário, abrigando o parasito adulto como também a fase larval, que é denominado de cisticercose humana (ACHA & SZIFRES, 1986; REY, 1991). Na maioria das vezes, a endemicidade desta enfermidade está relacionada às precárias condições sanitárias e ao baixo nível socioeconômico, permitindo o acesso da população ao consumo de carne de má procedência, verduras e água contaminada, falhas no saneamento básico, na fiscalização sanitária, hábitos de consumo pela população em geral como a ingestão de carne crua ou mal cozida, desconhecimento da população sobre a doença (LINO *et al.*, 2006) e falta de programas públicos de saúde específicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), a neurocisticercose é responsável por 50.000 óbitos por ano em países subdesenvolvidos.

A importância da saúde pública na disseminação das doenças geralmente está associada às condições socioeconômica e cultural dos países em desenvolvimento. Na década de oitenta, a cisticercose humana apresentava distribuição mundial (MACHADO *et al.*, 1988). A endemicidade da cisticercose em algumas regiões do país está relacionada ao fato da ingestão de carne com cisticercos ou canjiquinhas, como normal, facilitando a sua disseminação, principalmente na Ásia, África e América Latina (MENDES *et al.*, 2005).

Atualmente a importância da cisticercose na patologia humana está na dependência da localização do parasito em tecidos nobres, como globo ocular e sistema nervoso central (neurocisticercose). Outras localizações, como a subcutânea, muscular e a visceral, apresenta menor significância clínica. Porém, a presença de

cistos nessas localizações pode ser um indicador da presença de cistos nos tecidos mais nobres (VERONESI *et al.*, 1991).

A cisticercose pode ser classificada de acordo com a localização dos parasitos, segundo ZENTENO-ALANIS (1982) em: forma disseminada (com localização nas vísceras, pele e músculos), a oftalmocisticercose (nos olhos e órbita), a neurocisticercose (no sistema nervoso central) e, finalmente, a forma mista com mais de uma das localizações acima citadas.

A infecção no homem, quando assume a condição de hospedeiro intermediário do helminto, acontece da mesma forma, geralmente pela ingestão acidental de ovos de *T. solium* presentes em ambiente contaminado com fezes de origem humana. A contaminação de uma pessoa pode ser direta, com a ingestão dos ovos de um indivíduo por outro, por autoinfecção, devido a movimentos retro peristálticos do intestino que levam as proglotes para o estômago; ou por contaminação indireta, pela ingestão de alimentos ou água contaminada. Queremos ressaltar que, o suíno não é, de nenhuma maneira, a fonte de transmissão da cisticercose (ROPPA, 2006), pois, o complexo T/C é uma infecção de humano para humano, adquirida pela rota fecal-entérica, que ocorre principalmente em áreas com condições sanitárias deficientes (WHO, 2000).

De acordo com as pesquisas, o problema da infecção da carne de porco está intimamente relacionado à maneira com que os animais são criados. Animais criados em escala extensiva, contato mais intenso entre estes e os seres humanos, as infecções são nitidamente mais frequentes. A maneira mais eficiente de se quebrar o ciclo do complexo T/C é eliminar o contato entre os suínos e os excrementos humanos. O suíno constitui o hospedeiro intermediário da teníase, sua contaminação ocorre somente pela ingestão dos ovos de tênia do solo ou de alimentos (ou água) contaminados com fezes de pessoas portadoras de teníase. A presença de cisticercose em animais, principalmente suínos, demonstra sempre condições sanitárias inadequadas nos plantéis (ACHA & SZYFRES, 1986; Rey, 1991).

A cisticercose é adquirida através da ingestão dos ovos de *T. solium*, em vegetais, água contaminados, e através do contato fecal – oral. O ciclo de vida da *T. solium* é mostrado na Fig. 1. Os ovos de *T. solium* são eliminados nas fezes e contaminam os alimentos pela falta de higiene. Quando estes são ingeridos e expostos ao suco gástrico no estômago humano, eles perdem a sua cápsula protetora e se transformam em cistos de larvas, chamadas oncosferas que são capazes de

atravessar o trato gastrointestinal e migram através do sistema vascular para o cérebro, músculo, olhos, e outras estruturas. Uma vez no cérebro, os cistos larvais (cisticercos) inicialmente geram uma resposta imunitária mínima e podem permanecer no cérebro como cistos viáveis durante anos. (DEL BRUTTO, 2012).

A teníase é adquirida através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cisticercos. Sob ação da bile, os cisticercos se desinvaginam liberando o escólex. O verme adulto se fixa no intestino e começa a expelir os ovos e proglótides, que são excretados nas fezes humanas e podem contaminar o solo, a água e os alimentos. (FLISSER, 1991).

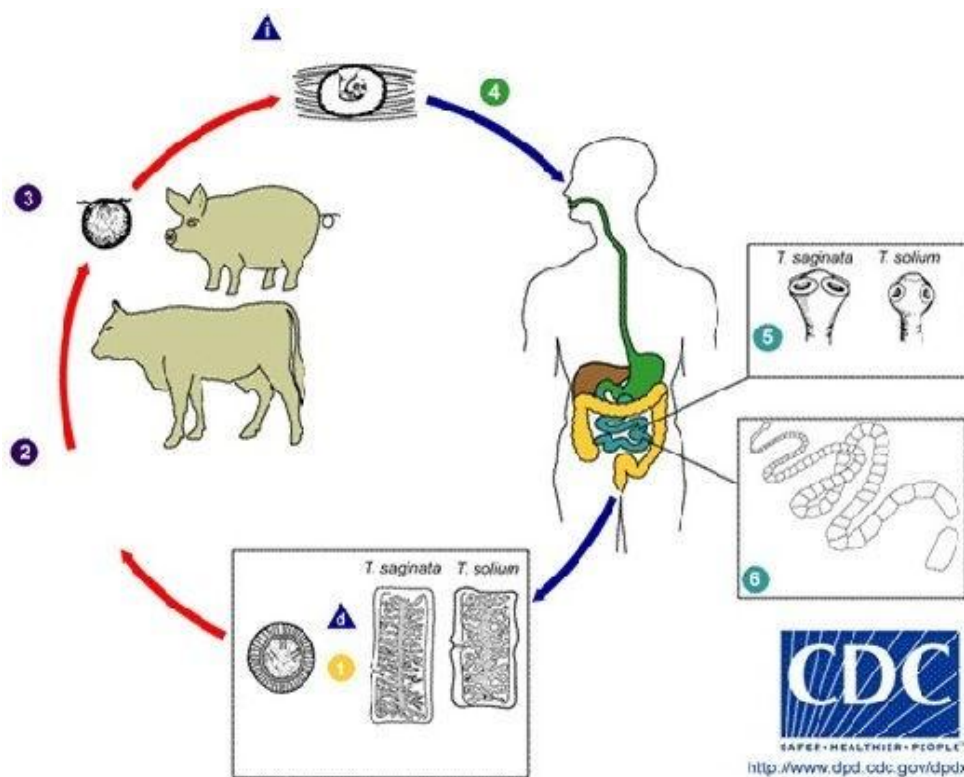


Figura 1: Ciclo biológico da *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Fonte: www.dpd.cdc.gov

Inicialmente, têm-se ovos e proglotes grávidas nas fezes que passam para o ambiente (1), bovinos (*T. saginata*) e suínos (*T. solium*), infectam-se inicialmente pela ingestão de vegetação contaminada por ovos ou proglotes grávidas (2), as oncosferas penetram na parede intestinal, caindo na circulação sanguínea e linfática e fixando-se nos músculos (3), os humanos infectam-se pela ingestão de carne crua ou mal cozida (4), o escólex se fixam no intestino (5), vermes adultos no intestino delgado (6). Estágio infectante (d) e estágio infectante (i) (Adaptado de CDC, 2011).

1.3 Patologia da NCC

A infecção humana natural depende da localização, do estágio larval, do número de parasitos e da resposta imune do hospedeiro. Dois mecanismos principais são responsáveis pela ação patogênica do parasito no SNC: o efeito mecânico proporcional ao volume relaciona-se com a localização da vesícula; e o efeito tóxico, que pode ser local, perifocal ou à distância. A NCC é uma doença pleomórfica, em que o SNC é afetado pela presença do parasito propriamente dito, pela reação inflamatória, fibrose residual, granuloma ao redor do parasito e pela calcificação dos restos do parasito. O SNC reage com a formação de inflamação, causando desmielinização da substância branca, proliferação glial e infiltração de células (ALVAREZ *et al.*, 2006).

Os efeitos tóxicos destes cistos podem ser observados no local de implantação como também no hipocampo, que está localizado no lobo temporal. O hipocampo é bi laminar, composto por duas regiões (corno de Amon e giro denteado). Ambas as regiões possuem três camadas, formadas por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Amon (CA). O CA se subdivide nos setores CA1, CA2, CA3 e suas três camadas são molecular, piramidal e polimórfica. As três camadas do giro denteado são: camada molecular, a granular, e neurônios da região polimórfica do giro denteado que, entre outros tipos neuronais, contêm as células musgosas (GRAY *et al.*, 1995). Os cisticercos e seus efeitos tóxicos são responsáveis pelas manifestações clínicas na NCC, consistindo em perda neuronal e desmielinização (KANNER, 2005; LASSMANN, 2007; STEINMAN, 2001).

Todavia, os cistos calcificados não são invariavelmente epileptogênicos, e a presença de lesões cisticercóticas na ressonância magnética pode ser facilmente detectada em pacientes assintomáticos. Em certas condições podem contribuir para o desenvolvimento de epilepsia, sendo que as alterações ou dispersões das células que compõe o hipocampo estão fortemente associadas como causas frequentes de epilepsia na NCC (SILVA, *et al.*, 2006).

Os aspectos anatomopatológicos da NCC são bastante variáveis e podem ser agrupados em formas anatomoclínicas básicas. Estas formas são caracterizadas em etapas, como: etapa vesicular (EV), vesicular coloidal (EVC), granular-nodular (EGN) e etapa nodular calcificado (ENC) (LINO-JR *et al.*, 2002). Na etapa vesicular,

os cisticercos apresentam-se viáveis, com membrana transparente, líquido vesicular claro, e escólex invaginado mostrando estrutura semelhante ao helminto adulto da *T. solium*. Nesta fase, os cisticercos podem permanecer por anos, e se forem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, sofrem várias agressões, podendo levar a morte do parasito, transformando-o em um nódulo mineralizado ("fase calcificada"). Da etapa vesicular ao calcificado, os cisticercos muitas vezes se diferenciam através de dois estágios intermediários de involução, que são chamados de " granular e coloidal ", respectivamente. Este processo não é seguido por todos parasitos, algumas vezes podem ser destruídos logo após entrar no SNC, ou podem ir diretamente para a etapa granular, sem passar pelas etapas intermediárias. Esta última hipótese é mais aceita, devido à baixa sensibilidade dos ensaios sorológicos em pacientes com um único granuloma de cisticercos (DEL BRUTTO, 2014).

Com relação à análise macroscópica, os cisticercos podem ser encontrados na convexidade ou na base do encéfalo, no parênquima encefálico e nos ventrículos. No parênquima, as vesículas são mais comumente encontradas na substância cinzenta do que na substância branca, favorecido pela circulação encefálica. Quando os cisticercos se alojam no aqueduto de Silvius, ou no quarto ventrículo, podem produzir hidrocefalia não comunicante. O grau de dilatação ventricular depende principalmente da gravidade e duração da obstrução (AGAPEJEV *et al.* 2007). Cisticercos alojados nas meninges são designados de formas meníngeas, provocando reação inflamatória seguida de fibrose. Além da variedade de localização dos cisticercos, estes podem apresentar diferentes graus de maturação, os quais podem ser classificados em formas ativas e inativas. Nesta fase, alguns fatores podem influenciar, como: o tamanho do parasito, estágio evolutivo de desenvolvimento e as propriedades nutricionais do lugar de instalação (FLISSER *et al.* 1982; MÁRQUEZ-MONTER, 1972).

Nas análises microscópicas, se diferenciam quanto à sua viabilidade. Cisticercos em fase vesicular no parênquima cerebral induzem pouca ou nenhuma reação inflamatória, presença de poucos fibroblastos e discreta gliose. Na fase coloidal, normalmente estão rodeados por uma cápsula de colágeno, reação inflamatória intensa, essencialmente de mononucleares, proliferação microglial e edemas. O edema desaparece quando os parasitos entram em fase granular ou nodular calcificados, rodeados de células multinucleadas, que são associados à gravidade da doença (DEL BRUTTO, 2014; PITTELLA, 1997). As arteríolas podem

estar comprometidas, podendo levar a oclusão completa por proliferação endoarterial ou trombos. O processo inflamatório e as lesões decorrentes relacionam-se com o estágio e a viabilidade dos parasitos (MÁRQUEZ-MONTER, 1972; PITTELLA, 1997). Nas meninges, observa-se espessamento das mesmas, levando a meningite e hidrocefalia pelo bloqueio da circulação liquórica.

No espaço subaracnóide o processo inflamatório é composto por linfócitos, células gigantes multinucleadas, fibras colágenas e raros eosinófilos. Esta reação inflamatória pode ser prejudicial ao quiasma óptico e aos nervos cranianos (DEL BRUTTO, 2014). Os episódios irritativos recorrentes nas meninges ocasionam meningite proliferativa, puramente por razões físicas, devido ao movimento constante do LCR, nos ventrículos laterais. Este movimento do fluxo possibilita a perda de estruturas internas dos cisticercos, adquirindo aspecto macroscópico de racemoso. Nesta etapa, eles aderem entre si, formando vesículas de paredes delgadas, translúcidas e sem escólex interior. Acredita-se que este estágio se deve à sua localização (MÁRQUEZ-MONTER, 1972; PITTELLA, 1997). Dependendo do tamanho das vesículas, produzem um quadro oclusivo. Nos ventrículos apresentam-se em números e estágios de maturação variados, podendo estar livres, ou aderidos na camada ependimal. Estes cisticercos, quando aderidos, adquirem forma pendiculada, levando a ependimite granularis, com reação inflamatória inespecífica e proliferação celular (DEL BRUTTO, 2014). No epêndima, observam-se áreas de epitélio normal cúbico e áreas granulares, com discreta proliferação vascular, edema, e gliose do tecido nervoso subjacente (AGAPEJEV *et al.*, 2007). Nesta etapa, observa-se cápsula fibrosa, células gigantes multinucleadas e focos de células inflamatórias, levando ao quadro de hidrocefalia, que é decorrente de complicações da NCC (MÁRQUEZ-MONTER 1972). A forma mais frequente de hidrocefalia associa-se com meningite basal cisticercótica, pela presença dos parasitos nos ventrículos, responsável pelo aumento da pressão intracraniana (GASPARETTO *et al.*, 2008; MÁRQUEZ-MONTER, 1972).

1.4 Inflamação e neurodegeneração na NCC

A homeostasia nos tecidos em geral tem como objetivo manter a integridade e manutenção das células. Quando a integridade é perdida pela presença do patógeno, toxinas, traumas ou de doenças, perde-se esse equilíbrio homeostático. Em resposta a

tais situações, onde os mecanismos de defesa e manutenção agem no restabelecimento da integridade tecidual (XANTHOS & SANDKÜHLER, 2014).

As reações inflamatórias no CNS diferem substancialmente daquelas apresentadas em outros tecidos, devido à carência de células dendríticas residente, macrófagos perivasculares (HICKEY & KIMURA, 1988). Quem assume essa função são os pericitos vasculares (BALABANOV *et al.*, 1999). Estas características peculiares do SNC levaram à concepção de que este órgão representava um sítio imune privilegiado, devido a um sistema de barreira especial, que limitava o influxo de partículas e células, chamado de barreira hematoencefálica (BHE) (SCHWARTZ *et al.*, 2001).

O termo “imune privilegiado” foi inicialmente interpretado para indicar a completa ausência de células imunológicas no SNC. Atualmente, existe um novo conceito, onde mostram que esse privilégio não é total. Existem fortes evidências na literatura, que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, trauma do cérebro e medula espinhal e acidente vascular encefálico (WYSS-CORA *et al.*, 2002).

Durante a infecção, a barreira hematoencefálica (BHE) torna-se mais permeável, e a falência desta é um evento crítico no desenvolvimento e progressão de várias doenças inflamatórias no SNC (BROOKS *et al.*, 2005; HAWKINS & DAVIS 2005; OTTO *et al.*, 2002; YATSIV *et al.*, 2002). A barreira hematoencefálica (BHE) é constituída por células endoteliais especializadas, formando uma rede elaborada de junções de oclusão inter-endotelial complexa com o objetivo de inibir o tráfego de células e moléculas, podendo ser alteradas pelas citocinas pró-inflamatórias (FOX *et al.*, 2000). Os linfócitos T não ativados apresentam trânsito livre pela BHE, pois participam dos mecanismos de imuno sobrevivência (OKSENBERG *et al.*, 2001).

A inflamação é um processo complexo, consistindo de vários aspectos determinantes do hospedeiro, e está envolvida na patogênese de várias desordens cerebrais, como também da NCC. A presença dos cisticercos no encéfalo leva a: 1) ativação de micróglia/macrófagos residentes com mobilização e 2) infiltração de células inflamatórias periféricas com destruição tecidual (CAMPANELLA *et al.*, 2002). A progressão sequencial desses eventos pode levar a morte dos cistos, devido ao tratamento que pode ter sido inicialdo pelo paciente, ao atrito normal com o tecido do hospedeiro, ou ainda pela ativação da resposta inflamatória, normalmente

observado em formas de granulomas, que podem levar a diferentes tipos de manifestações clínicas (WHITE *et al.*, 1997). No entanto, as células residentes do SNC fazem o primeiro contato com o patógeno, e sob condições severas, permitem o influxo de células do sangue periférico para o local da infecção, mas com certa restrição na tentativa de proteger os neurônios (HICKEY *et al.*, 1991).

Na cisticercose a larva metacestóide deve permanecer viável por mais tempo possível no tecido do hospedeiro intermediário, para poder infectar o hospedeiro definitivo. Essa manutenção do ciclo biológico de *Taenia sp.* depende principalmente do tipo de inflamação local. Em suínos, a presença de cisticercos viáveis de *T. solium* desencadeia discreta reação inflamatória e pequeno granuloma, ao passo que cisticercos mortos (inviáveis) geram intensa reação inflamatória composta principalmente de eosinófilos que levam a destruição dos parasitos (DE ALUJA & VARGAS, 1988; DE ALUJA *et al.*, 1998; FLISSER *et al.* (1990)).

Na neurocisticercose humana a reação inflamatória apresenta níveis aumentados das interleucina (IL) 6 e IL-1 no CSF (fluido cérebro espinhal) e no soro (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.* 1996), aumento de IL-5 (EVANS *et al.*, 1998) e da eotaxina no soro (RESTREPO *et al.* 1998). Ao redor dos cistos observaram citocinas do tipo Th1 e Th2 (DE ALUJA & VARGAS, 1988; FLISSER, 1990). Em pacientes com um único cisto, observou-se aumento da IL-2 no sangue periférico *in vitro*, quando estimulado com Concanavalin A (MEDINA-ESCUITA, 2001). Entretanto, grandes reações inflamatórias podem estar associadas à destruição da larva metacestóide, e seus efeitos patológicos pela formação de granulomas em pacientes sintomáticos (CARPIO *et al.*, 1998; WHITE, 2000).

Acredita-se que a inflamação no SNC, ou neuroinflamação, é induzida apenas por um estado patológico, geralmente sob a forma de uma infecção microbiana, ou de suas toxinas, ocasionando algum tipo de degeneração (TSUNODA & FUJINAMI, 2002). A neuroinflamação é um mecanismo importante na proteção do cérebro pela liberação de citocinas (CACQUEVEL *et al.*, 2004) e quimiocinas (UBOGU *et al.*, 2006) pelo sistema imunológico.

Há evidências substanciais de que o estresse oxidativo gerado na inflamação é um causador, ou, pelo menos, um fator auxiliar na patogenia das principais doenças neurodegenerativas (UTTARA, SINGH *et al.*, 2009; FERRETTI E BACCHETTI, 2011; OLIVEIRA, KALLAUR *et al.*, 2012). As espécies reativas do oxigênio (EROs) são implicadas como mediadores na desmielinização e dano axonal pelos

seus altos níveis locais em condições inflamatórias. Em contrapartida os macrófagos ativados e micróglias agem na defesa antioxidante no interior das lesões (VAN MEETEREN, TEUNISSEN *et al.*, 2005; VAN HORSSSEN, WITTE *et al.*, 2012). Os danos induzidos pelos EROs ou ERNs (espécies reativas do nitrogênio), podem levar a peroxidação das membranas lipídicas que podem se acumular dentro de macrófagos, como também podem ser responsáveis em alterações de moléculas biológicas, incluindo o DNA, o RNA, lipídios, proteínas e carboidratos (TURKO, MARCONDES *et al.*, 2001). As modificações no SNC levam a diferentes tipos de resposta inflamatória, que permite a destruição ou a proliferação do parasito (CHAVARRIA *et al.*, 2005; SCIUTTO *et al.* 2007)

As células residentes do SNC tem papel crucial na inflamação e neurodegeneração de várias doenças neurodegenerativas. As micróglias ou macrófagos residentes do SNC, possuem semelhanças com as células da linhagem dos monócitos (LING and WONG, 1993). Quando ativadas podem interferir na função neuronal (KREUTZBERG, 1996), pela produção de catecolaminas (neurotransmissores), exercendo efeitos na ativação, proliferação e apoptose nas células (OFFEN *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 2003). Apresentam moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade), mas é incerto se podem funcionar como células apresentadoras de antígenos (APCs) *in vivo*. As adipocinas (citocinas), podem aumentar a produção de citocinas pró ou anti-inflamatória (OUCHI *et al.*, 2011; ABELLA *et al.*, 2014) e participam diretamente do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PIEHL LIDMAN, 2001). Na ativação crônica podem provocar neurodegeneração pelos seus efeitos tóxicos (DAVIS *et al.*, 2013; CARSON *et al.*, 2008).

Ainda pouco se sabe sobre a presença de macrófagos espumosos, mas estes estão presentes em grande quantidade no processo inflamatório crônico em geral, como também na NCC, como resultado da fagocitose das membranas das células destruídas. Normalmente as células dos mamíferos são protegidas dos efeitos tóxicos do excesso de colesterol, por múltiplos complexos e mecanismos, incluindo diminuição da sensibilidade de receptores de LDL, em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de colesterol (JANCIAUSKIENE *et al.*, 2001; VAINIO & IKONEN, 2003). Os macrófagos espumosos apresentam acúmulo de colesterol devido a entrada acelerada e o efluxo reduzido. Em experimentos *in vitro* têm demonstrado que LDL oxidado, induz mais eficientemente a formação de

macrófagos espumosos, que o LDL normal (SONG *et al.*, 2001). O LDL oxidado forma a lisofosfatidilcolina, pró-inflamatória (lysoPC), que favorecem a produção de citocinas, como IL-1 β , IL-12, IL-6 e TNF- α em macrófagos classicamente ativados (QIN *et al.*, 2014). Se o lipídio se associa ao HDL, a esfingosina-1-fosfato (S1P) mostra-se protetora, promovendo a polarização para AAM, estimulando a produção e de IL-4, em estudos sobre arteriosclerose. Os macrófagos tratados com S1P reduz o armazenamento de lipídios de forma dependente da IL-4. Os papéis opostos de LDL e HDL interferem na polarização de macrófagos e seus efeitos no agravamento ou na inibição de doenças inflamatórias crônicas (PARK *et al.*, 2014).

Os astrócitos produzem moléculas da matriz extracelular que auxiliam na rede de apoio do SNC, como também na difusão de neurotransmissores e produção de fatores neurotróficos na manutenção da homeostasia (BEZZI & VOLTERRA, 2001; HAYDON, 2001). Possuem moléculas MHC de classe II, mas são incapazes de funcionar como APCs eficientes para células TCD4⁺, devido a baixa expressão de moléculas co-estimuladoras (ALOISI *et al.*, 2000; PIEHL & LIDMAN, 2001)]. Age na regulação da resposta imune, pela produção de fator de crescimento transformador (TGF)- β e indução de apoptose em células T (CONSTAM *et al.*, 1992, GOLD *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1993). Sabe-se que estas células são importantes na redução e manutenção de doenças neurodegenerativas do SNC, pois as células T reguladoras astrócito-induzida atrasam o início e a gravidade de doenças auto imunes, demonstrado pela administração intravenosa em ratos homogenato como modelo experimental da EAE (encefalite autoimune experimental) (TRAJKOVIC *et al.*, 2004) .

Os neurônios são muitas vezes considerados como espectadores passivos na resposta inflamatória. Contudo, eles podem regular a expressão de moléculas de MHC de classe I e II pelas células da glia circundante em resposta a atividade elétrica. Produzem citocinas como interferon-gama (FN- γ) e estimulam a apoptose de células T (FLÜGEL *et al.*, 2000; NEUMANN *et al.*, 1997; OLSSON *et al.*, 1989, 1994). Apesar de possuírem moléculas de MHC classe I e II, seu papel é controverso. Acredita-se que estas moléculas sirvam como alvo de ataque utilizados pelas células TCD8⁺ citotóxicos. Em camundongos nocaute para moléculas de MHC classe I, infectados cronicamente com TMEV (Vírus da encefalomielite murino de Theiler), observou-se redução na perda axonal e preservação das funções

neurológicas, mas apresentavam uma área de desmielinização extensa (RIVERA-QUINONES *et al.*, 1998).

1.5 Desmielinização na NCC

A desmielinização se refere ao processo de remoção das bainhas de mielina previamente formadas (FRANKLIN, 2002). A produção e manutenção da bainha são realizadas pelos oligodendrócitos e células de Schwann. A bainha de mielina é responsável pela transmissão do impulso nervoso de forma rápida e eficiente, integrando assim funções sensoriais, motoras e cognitivas eficientes (LAZZARINI, 2004; PURVES, 2005). Quando as bainhas de mielina sofrem alterações, o axônio fica desprotegido, necrosando a seguir. A desmielinização pode ter causas primárias, que ocorre pela: 1- instabilidade, 2- dano na célula mielinogênica (oligodendrócito e célula de Schwann) 3- na própria bainha de mielina, contudo há preservação dos axônios. Causa secundária, ocorre quando as bainhas de mielina são perdidas havendo a necessidade de reconstrução. Essa reconstrução é realizada pelos oligodendrócitos maduros, que ocupam a área desmielinizada (STANGEL & HARTUNG, 2002; ZHAO, FANCY *et al.*, 2005). A remielinização dos neurônios pode ocorrer pela invasão das células de Schwann ao SNC, quando os astrócitos desaparecem (GRACA e BLAKEMORE, 1986).

As doenças desmielinizantes têm sido estudadas, conhecidas e identificadas ao longo do tempo, na tentativa de facilitar os critérios diagnósticos, melhorando a clínica. Estas doenças podem ser classificadas de acordo com sua patogênese no SNC. Existem vários tipos: desmielinizações provocadas por processos inflamatórios, por infecção viral, por desarranjos metabólicos adquiridos, por compressão focal e as formas hipóxico-isquêmico. Algumas destas distinções são bastante simples, mas a classificação proporciona uma estrutura conceitual no intuito de facilitar o diagnóstico (LOVE, 2006).

1.5 a - Desmielinização por processos inflamatórios

Três doenças se enquadram nesta categoria: a esclerose múltipla, a encefalomielite disseminada aguda (EAD) e a leucoencefalite hemorrágica aguda (AHL). Nesse

grupo as doenças desmielinizantes caracterizam pela presença da inflamação que leva a destruição das bainhas de mielina, prejudicando a transmissão do impulso nervoso e o aparecimento de sinais neurológicos (KIPP, VAN DER VALK *et al.*, 2012). Essas doenças dependem de uma variedade de eventos, como o tempo de duração, o agente agressor, o local da inflamação, trauma mecânico e processos patológicos diferenciados, afetando tanto as células formadoras de mielina quanto os próprios neurônios (SIEGEL, 1999). O diagnóstico precoce resulta no início imediato da terapia reduzindo os surtos, e sintomas, bem como as incapacidades residuais.

O primeiro grupo de doenças compreendem as doenças autoimunes do SNC (esclerose múltipla) ou do SNP (Doenças desmielinizantes monofásicas - Neurite Ótica). São doenças desencadeadas por reações autoimunes, resultando na desmielinização da parte afetada impedindo que a mensagem do cérebro chegue a outras partes do corpo. A mais comum delas, é a esclerose múltipla, é patologicamente e patogeneticamente heterogênea. Encontra-se dividida de acordo com suas características clínicas e patológicas em quatro subtipos principais (clássica, aguda, neuromielite ótica e esclerose concêntrica). Pode apresentar ainda outras subdivisões patológicas diferenciadas, afetando tanto as células formadoras de mielina quanto os próprios neurônios (LOVE, 2006).

O segundo grupo são as encefalomyelites disseminadas agudas (EAD), é uma doença desmielinizante, cujo curso habitual é monofásico e a sua evolução é favorável. É uma doença inflamatória e difusa do SNC, geralmente ocorre após infecção ou vacinação. Seus sintomas aparecem entre 2 a 30 dias após a infecção viral ou bacteriana. As crianças do sexo masculino são as mais atingidas e o tratamento visa desacelerar a resposta inflamatória através de corticoterapia endovenosa (LEAKE *et al.*, 2004; MARTIN *et al.*, 1985).

O terceiro grupo são as leucoencefalites Agudas Hemorrágicas (AHL), é uma doença rara, geralmente fatal, acredita-se que possa ser uma variante hiperaguda de EAD. Como EAD, AHL pode ser precedida por infecção viral. Outras associações podem estar presentes, mas são raros os casos, que incluem colite ulcerativa, doença de Crohn e septicemia. As manifestações clínicas mais evidentes são a pirexia, dor de cabeça, vômitos, déficit neurológicos multifocal e convulsões, evoluindo dentro de 2 ou 3 dias por meio de sonolência, coma e morte (LEAKE *et al.*, 2002).

1.5 b - Desmielinização hipóxico-isquêmica

Uma redução significativa do fluxo sanguíneo na área isquêmica central causa alterações nos processos metabólicos, no suprimento energético da célula e na homeostase iônica, que gera perda da integridade celular, por necrose e apoptose em poucos minutos (LIPTON, 1999; SACCCO, 2002; MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004). Este fenômeno é conhecido como degeneração secundária, é definida como um grupo de eventos destrutivos que podem afetar células que não foram ou que foram apenas marginalmente afetadas pela lesão inicial (TATOR; FEHLINGS, 1991; MCDONALD; SADOWSKY, 2002). A hipóxia cerebral global pode apresentar diversas causas como: parada cardíaca, asfixia ou depressão da função cardiorrespiratória por overdose de drogas, nesses casos provocam uma leucoencefalopatia, com preservação relativa da substância cinzenta (GINSBERG *et al.*, 1976). A lesão tecidual é predominantemente necrótica, mas também se observa algumas áreas de desmielinização. A extensão das áreas desmielinizadas depende da intensidade e duração da exposição. Normalmente há áreas preservadas e áreas rarefeitas com células glióticas, devido a uma mistura de degeneração axonal e desmielinização (LOVE *et al.*, 2006). No entanto, sabe-se que excitotoxicidade e disfunção iônica, estresse oxidativo, resposta inflamatória e apoptose são eventos cruciais neste importante fenômeno patológico (PERRY *et al.*, 1995; CHOI, 1998 e 2000; VILA, 2003).

1.5 c - Desmielinização induzidas por compressão

Isso raramente é encontrado em neuropatologia de diagnóstico de rotina. O melhor exemplo documentado de compressão induzida por desmielinização, responsável por muitos casos de neuralgia trigeminal, que é a compressão do nervo trigêmeo e de sua raiz por uma artéria ou veia sobrejacente, perto da zona de entrada da raiz nervosa. Isto produz uma região focal de desmielinização não inflamatória, cerca de até 2 mm de diâmetro, na parte proximal da raiz nervosa (SNC), onde a compressão tem ocorrido (LOVE *et al.*, 2006). Nesses casos há grupos de fibras desmielinizadas justapostas, nos quais sugere que tais permitem a transmissão direta não sináptica de um impulso nervoso de um para outra (LOVE *et al.* 2006)

Todos esses eventos no SNC provocam uma série de alterações, que podem ser irreversíveis, culminando em morte celular. Ainda pouco se sabe sobre a desmielinização na NCC, mas está presente em grande porcentagem em doenças inflamatórias crônicas. A maioria dos estudos de NCC relatam processos inflamatórios, lesão tecidual, influxo de células inflamatórias, ativação de receptores, dentre outros. Todas as doenças que geram alterações do SNC, seja por um processo inflamatório, hipóxico-isquêmico ou induzido por compressão, podem levar as doenças desmielinizantes pela destruição da bainha de mielina (LUCCHINETTI *et al.*, 2000).

1.6 Aspectos Gerais da *Taenia crassiceps*

As características fisiopatológicas e a cinética da resposta inflamatória são difíceis de serem estudadas em seres humanos portadores de NCC, por isso, os modelos alternativos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos patogênicos foram criados diversos modelos experimentais, entre eles o modelo de *Taenia crassiceps*, pela facilidade na manutenção e reprodutividade dos experimentos.

A *T. crassiceps* foi descrita no século XIX pelos pesquisadores Zeder & Rudolphi, que a classificaram como um representante da família *Taeniidae*, classe *Cestoidea* e ordem *Cyclophyllidae*. O cestóide *T. crassiceps* foi inicialmente identificado como parasito de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), sendo encontrado principalmente na Europa (FREEMAN, 1962). O verme adulto foi detectado em áreas rurais da Grécia, infectando raposas vermelhas, lobos, chacais e gatos selvagens (PAPDOPOULOS *et al.*, 1997).

O ciclo de vida da *T. crassiceps* é mostrado na Fig. 2. As formas adultas de *T. crassiceps*, parasitam intestino delgado de canídeos, especialmente raposas, coiotes e cães domésticos (AROCKER-METTINGER *et al.*, 1992; FREEMAN, 1962; SHIMALOV & SHIMALO, 2003). Estes animais eliminam juntamente com as fezes, as proglotes grávidas contendo os ovos, no meio ambiente. Estes ovos são ingeridos por roedores (hospedeiros intermediários), onde liberam os embriões hexacantos (6 a 8 mm de diâmetro), que eclodem no trato digestório e penetram pela mucosa, migrando por via linfática e ou sanguínea, onde se alojam em um determinado órgão ou cavidade. Quando alojados, se desenvolvem em larvas metacestóides ou

cisticerco, que tem a capacidade de se multiplicar de forma assexuada por brotamentos, formada a partir de sua membrana externa. Estes brotamentos são liberados do cisticerco inicial, cerca de quatro semanas após seu surgimento. O hospedeiro definitivo (canídeos) ingere as larvas metacestóides presentes no hospedeiro intermediário, desenvolvendo o helminto adulto 34 a 70 dias após a infecção. Os cisticercos durante a digestão da carne, liberam o escólex sob ação da bile, sendo capazes de se fixar no intestino delgado. Em hospedeiros intermediários e acidentais (paratênicos) não foi relatada a cura espontânea (FREEMAN, 1962; MAILLARD *et al.*, 1998).

Ciclo Biológico de *T. crassiceps*

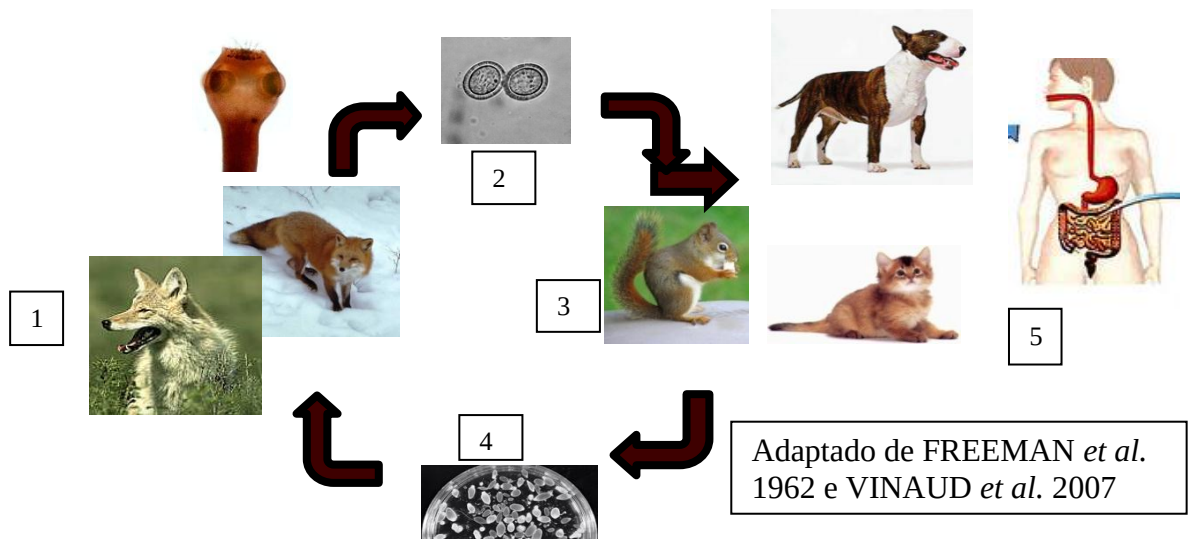


Figura 2. Ciclo Biológico de *Taenia crassiceps*.

Ciclo biológico de *T. crassiceps*, com seus hospedeiros definitivos (1) canídeos, (2) ovos, (3) hospedeiros intermediários - roedores, e (4) cisticercos, (5) hospedeiros paratênicos - mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos. Adaptado de Freeman *et al.* 1962 e Vinaud *et al.* 2007.

Pode ainda ocorrer a cisticercose causada por *T. crassiceps* em humanos de forma acidental, atuando assim como hospedeiro paratênico deste parasito. A cisticercose humana por *T. crassiceps* ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos como indivíduos portadores de HIV (FRANCOIS *et al.* 1998) ou com neoplasias como o linfoma (HELDWEIN *et al.*, 2006). No entanto, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver cisticercose por

T. crassiceps (AROCKER *et al.* 1992). Existem outros casos descritos na literatura de cisticercose no sistema nervoso central e no subcutâneo em animais domésticos como cães e gatos ressaltando a importância destes na transmissão e incidência da cisticercose humana por *T. crassiceps* (WUNSCHMANN *et al.*, 2003).

1.7 Modelo experimental de NCC

Devido à necessidade de se estudar a NCC, viu-se no interesse em buscar fontes alternativas de antígenos, com intuito de auxiliar as pesquisas e oferecer informações plausíveis, para descobrir e auxiliar em novas tecnologias no tratamento da NCC.

Um dos primeiros estudos do antígeno alternativo de *T. crassiceps*, foi realizado na Alemanha e publicado em 1989. Neste estudo, utilizou-se a purificação do fluido vesicular de *T. crassiceps*, por cromatografia de afinidade, utilizando soro de coelho imunizado com *T. solium*. A fração purificada apresentou nove antígenos de reatividade cruzada com *T. solium*. Essa semelhança antigênica entre o cisticercos de *T. solium* e a cepa (ORF-do inglês Original Fox) utilizada pelo grupo do nosso laboratório, vem oferecendo várias vantagens. Além das similaridades antigênicas, também possui boa reprodutividade, facilidades de manutenção em laboratório, estimulando o seu uso em pesquisas científicas, principalmente aquelas relacionadas com as áreas bioquímicas, imunológicas e na patologia (VAZ *et al.*, 1997). A cisticercose possui como modelo experimental, a infecção em camundongos com cisticercos de *Taenia crassiceps*, o que induz uma enfermidade semelhante à cisticercose humana, incluindo a possibilidade de reproduzir a NCC, forma grave da doença (CARDONA & TEALE, 2002).

Atualmente existem quatro tipos diferentes de modelo experimentais para NCC. O primeiro foi desenvolvido nos EUA, onde utilizaram camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com *Mesocostoides corti* (CARDONA *et al.*, 1999). Posteriormente no Brasil, pesquisadores, utilizaram cisticercos de *T. crassiceps* em camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 (MATOS-SILVA *et al.*, 2012). Mais recentemente no Peru, desenvolveram um modelo em ratos inoculados com cistos de *T. solium* (VERASTEGUI *et al.*, 2015) e no México inocularam cistos (oncosferas) de *T. solium* em suínos jovens (FLEURY *et al.*, 2015).

A partir do trabalho inicial realizado por Cardona e colaboradores, alguns estudos foram desenvolvidos nesta área, como o papel dos linfócitos T gama-delta (CARDONA *et al.*, 1999, 2002, 2003), expressão e distribuição de receptores Toll-like (MISHRA *et al.*, 2006), migração de leucócitos para o sistema nervoso central (SNC) (ALVARES *et al.*, 2006, 2007, 2008), estudo das proteínas do complexo juncional (ALVARES *et al.*, 2007) e estratégias de evasão imune do parasito (ALVARES *et al.*, 2008).

No modelo de infecção clássico encontrado na literatura, utiliza-se a injeção de cerca de 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial (fase viável), na cavidade peritoneal, onde os parasitos normalmente se desenvolvem em camundongos BALB/c fêmeas, mas são controlados com aproximadamente 30 dias em C57BL/6 (FRAGOSO *et al.*, 1998).

No modelo experimental de NCC de Matos-Silva *et al* (2012), utilizou-se duas linhagens de camundongos, C57BL/6 e BALB/c e observaram necrose acentuada dos parasitos no C57BL/6 aos 90 dias após a infecção (DAI). O processo inflamatório inicial foi difuso nos C57BL/6 e de polimorfonucleares nos BALB/c e nas fases tardias, foram predominantemente de mononucleares. Os camundongos BALB/c apresentaram maiores lesões teciduais, devido à intensidade do infiltrado inflamatório, mas os C57BL/6 foram hábeis em conter o crescimento levando a morte do parasito. Provavelmente a forte resposta imune celular do tipo Th1, característica dos animais C57BL/6, tenha sido responsável pelos danos teciduais logo na fase inicial da infecção, que resultou na redução da proliferação dos parasitos desencadeando morte rápida.

1.8 Imunopatologia da Cisticercose Experimental por *T. crassiceps*

Todo e qualquer processo infeccioso quando se instala ativa o sistema imune, que visa gerar uma resposta eficiente na eliminação do agente agressor. Porém, nem sempre há eliminação completa desses ou de outros parasitos, desenvolvendo doenças. Sendo assim, a cisticercose experimental vem sendo utilizada para explorar a função dos fatores biológicos envolvidos na suscetibilidade do hospedeiro, como fatores genéticos e a condição imune, que afetam o crescimento parasitário. Além disso, a suscetibilidade à infecção por *T. crassiceps* em camundongos está associada

ao gênero. Estudos anteriores demonstram que camundongos fêmeas são mais suscetíveis à infecção pela alta concentração do hormônio estrógeno, envolvendo um mecanismo imune endócrino, que facilita seu crescimento em um ambiente permissivo (LARRALDE *et al.*, 1995).

Sendo assim, camundongos da linhagem BALB/c mostram-se suscetíveis à infecção larval com *T. crassiceps*, com predominância da resposta imune do tipo Th2, que permite o crescimento parasitário (RESTREPO *et al.*, 2001; FRAGOSO *et al.*, 1998; VILLA& KUHN *et al.*, 1996). Ao contrário, camundongos C57BL/6 são conhecidos por serem geneticamente resistentes a infecção, com larvas de *T. crassiceps*, conseguem restringir a proliferação do parasito (TERRAZAS *et al.*, 2008).

Durante a infecção experimental por cisticerco de *T. crassiceps*, observa-se que nos estágios iniciais da doença, as células esplênicas estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA), produzem preferencialmente citocinas do perfil Th1 (RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TERRAZAS *et al.*, 1998; TOENJES & KUHN, 2003; TOENJES *et al.*, 1999). Este fato está associado a uma maior destruição do parasito e uma carga parasitária baixa (ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007; MOONEY *et al.*, 2000; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TERRAZAS *et al.*, 1998). Em fases mais avançadas da doença, as citocinas encontradas após o estímulo de células esplênicas com a concanavalina A, são do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TERRAZAS *et al.*, 1998; TOENJES & KUHN, 2003, TOENJES *et al.*, 1999). Estas citocinas estão associadas à modulação da resposta inflamatória, (CONTI *et al.* 2003, ROBINSON *et al.*, 1997) que pode ser devida a presença de vários linfócitos B e T no local da infecção, estimulados pelos antígenos do parasito, inibindo a produção do IFN γ (PADILLA *et al.*, 2001, TOENJES *et al.*, 1999). Este resultado é decorrente da combinação da resposta imune às larvas, com os produtos imunoregulatórios liberados pelos cisticercos quando estimulados com Con.A e antígenos do parasito (TOENJES *et al.*, 1999).

Como citado anteriormente, a resistência a helmintos é dependente da resposta Th2 (GAUSE *et al.*, 2003; LOCKSLEY, 1994; TERRAZAS, 2008), entretanto esta resposta Th2, está associada a um aumento na susceptibilidade de camundongos infectados com helmintos localizados em tecidos fora do intestino (ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002). No caso da cisticercose por *T. crassiceps*, observa-se que a resistência é dependente da resposta

Th1, pois animais desprovidos do gene de STAT4, os quais não são capazes de gerar resposta Th1, apresentaram maior dificuldade em controlar a proliferação do parasito. Por outro lado, animais desprovidos do gene de STAT6, os quais não são capazes de gerar resposta Th2 eficiente, são mais resistentes à infecção (ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2004).

A literatura tem relatado que, na progressão da infecção intraperitoneal com cisticercos de *T. crassiceps*, a resposta imune é polarizada para Th2, refletindo a habilidade deste parasito e seus antígenos na indução deste tipo de resposta (TERRAZAS *et al.*, 1998). Isto provavelmente se deve pela habilidade destes parasitos em evadir modulando a resposta imune do hospedeiro. Para garantir sua sobrevivência, eles empregam uma variedade de estratégias como: produtos excretados e secretados (E/S), liberados pelos próprios parasitos, que induzem a resposta imune antiparasitária, bem como alterações das funções das células imunes. A paramiosina presente no parasito (LACLETTE *et al.*, 1990), inibe a via clássica do complemento, já a taeniaestatina inibe tanto a via clássica, como a via alternativa do complemento, e algumas proteases, como a tripsina. As prostaglandinas E2 (PGE2) também tem sido isoladas como produtos excretados e secretados de cisticercos de *Taenia sp.* Este é um mediador lipídico, que inibe a geração de citocinas Th1, diminuindo a inflamação (ARECHAVALETA *et al.*, 1998; LEID *et al.*, 1983). A superfície do parasito é recoberta por uma camada de polissacarídeo, que dificulta a ativação do sistema complemento na parede do cisto (WHITE, 2000). O cisticerco secreta proteases, que podem degradar IL-2 e imunoglobulinas, além de possuírem antígenos, que induzem apoptose de linfócitos TCD4⁺ e CD19⁺ (LOPEZ-BRIONES *et al.*, 2003; WHITE, 2000).

Na Fig. 3 observa-se o esquema representativo da resposta imune na NCC. A morte do parasito é provavelmente iniciada pela secreção de citocinas Th1, resultando no influxo de células inflamatórias e formação de granuloma. Este processo inflamatório é rápido e temporário, ativando uma série de citocinas, quimiocinas e de moléculas sinalizadoras, que limitam a infecção ou restringem o dano tecidual. No entanto, a ativação exacerbada ou a falência da imunomodulação dessas respostas pelas citocinas do tipo Th2 e T regulatórias (Treg), contribuem para estados de doença aguda, ou desordens inflamatórias crônicas (TERRAZAS *et al.*, 2008). É observado também, influxo de monócitos e macrófagos classicamente

ativados (M1). Os macrófagos, nos granulomas ativados pelo IFN-gama, são capazes de eliminar cisticercos, por meio da ativação da enzima fagócito-oxidase e produção de ROS e metabólitos dos reativos do nitrogênio como, o NO, os quais podem destruir o parasito (ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007). As células Th17 podem contribuir pelo influxo de neutrófilos como também podem associar-se a lesões teciduais (YAO *et al.*, 1995). Macrófagos e linfócitos T foram encontrados intimamente localizados na camada fibrosa do granuloma, já os eosinófilos foram incomuns em granulomas murinos e humanos (TERRAZAS *et al.*, 2008).

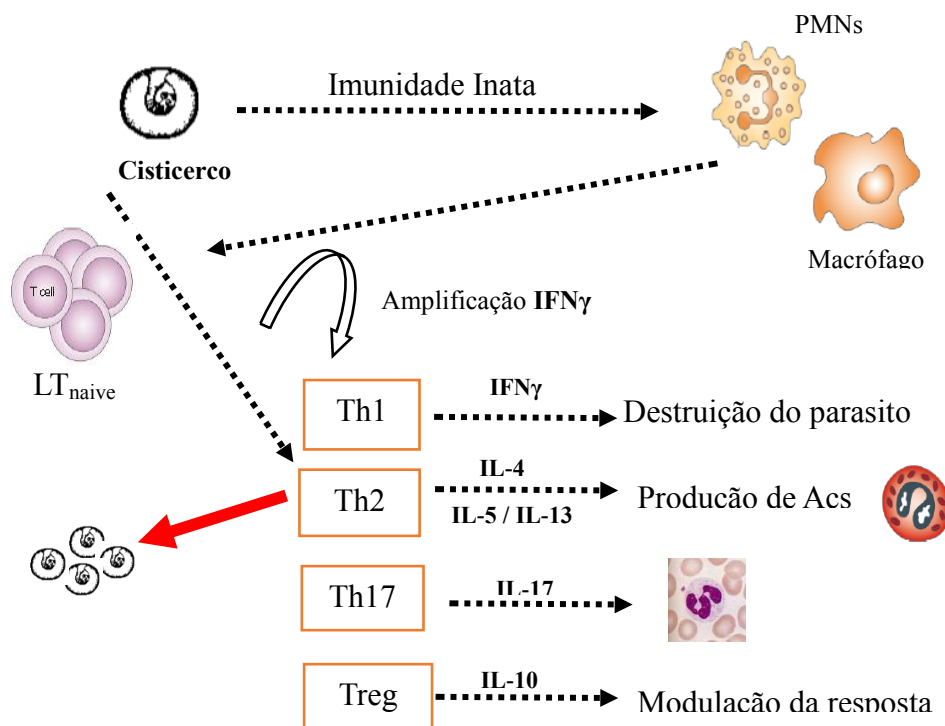


Figura 3. Resposta imune inata e adaptativa provocada pelos cisticercos.

Ao entrar os cisticercos desencadeiam resposta imune inata inicial e depois resposta imune adaptativa pelos diferentes perfis de linfócitos T. O Th1 pode levar a destruição do parasito como também lesão tecidual. A resposta imune reguladora Th2 e T reg diminui a liberação de citocinas inflamatórias, mas podem ativar linfócitos B e proliferação do parasito. O Th17 responsável pelo influxo de células inflamatórias e lesão tecidual (TERRAZAS *et al.*, 2008; ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A utilização de modelos experimentais nesta pesquisa, tem sido essencial para o avanço do conhecimento de diversas doenças, bem como na avaliação de abordagens terapêuticas cirúrgicas e medicamentosas e no estudo da fisiopatologia de diversas doenças. Neste estudo utilizou-se cisticercos da cepa ORF (Original Fox) de *T. crassiceps*, por dois motivos: semelhança antigênica com os cisticercos de *T. solium*, e facilidade na manutenção e reprodutividade da NCC.

O estudo da resposta imune e das lesões teciduais ao longo do tempo em seres humanos tem sido limitado pelo tratamento que pode interferir na resposta imune como também avaliação das lesões em pacientes vivos.

Será a primeira pesquisa da resposta imune *in situ* e sistêmica como também avaliações dos padrões normais de mielina na NCC intraventricular experimental causada por *T. crassiceps*. O entendimento desses dois parâmetros que se associam com as manifestações clínicas podem direcionar ou implementar novas estratégias que contribuam para o tratamento das disfunções neuromotoras e correlatas a diferentes formas de NCC.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar as lesões teciduais e perfil de citocinas na neurocisticercose experimental em camundongos BALB/c fêmeas, inoculadas com cisticercos viáveis de *T. crassiceps*.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar as lesões inflamatórias no encéfalo de camundongos da linhagem BALB/c, inoculados ou não com cisticercos viáveis de *Taenia crassiceps*;
2. Avaliar a resposta imune celular *in situ* pelas concentrações de citocinas (Interferon-gama, Interleucina-4, Interleucina-10 e IL-17);
3. Avaliar a resposta imune celular sistêmica pelas concentrações de citocinas (Interferon-gama, Interleucina-4, Interleucina-10 e IL-17) na cultura das células do baço;
4. Avaliar o padrão de desmielinização no encéfalo de camundongos da linhagem BALB/c, inoculados ou não com cisticercos viáveis de *Taenia crassiceps*.

4 MÉTODOS

A realização desta pesquisa obedeceu às normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFG), aprovado e protocolado pelo nº 010/11.

A manutenção da cepa ORF de *Taenia crassiceps*, foi realizada, por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, desde 2002, de acordo com Vaz *et al.*, (1997). Esta cepa é mantida no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

4.1 – Infecção

Para a infecção experimental de NCC, utilizou-se camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade (n=40). Após a remoção dos cisticercos de *T. crassiceps* provenientes de camundongos com infecção intraperitoneal de manutenção do parasito, os cisticercos foram lavados 2 vezes com PBS, colocados em placa de petri e separados de acordo com o estágio de evolução (VINAUD *et al.*, 2007). Somente os cisticercos no estágio inicial (sem brotamentos com líquido translúcido e membrana vesicular) foram seleccionados para serem inoculados no SNC dos camundongos. O grupo controle foi inoculado com 10µl de solução fisiológica.

Após a anestesia (0,01mL/g de Xilazina a 2% e Ketamina 10%), realizou-se a tricotomia e a anti-sepsia com álcool iodado. Uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo foi realizada para expor a superfície do crânio e para visualização das junções ósseas e o ponto bregma utilizou-se peróxido de hidrogênio a 30%. O animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, onde a torre foi posicionada na vertical com o ponto bregma (angulação zero). Nesta etapa anotam-se os valores dos paquímetros posicionados nos eixos x e y. Para localização exata do ventrículo esses valores serão ajustados (AP-3.0, lateral +2.0) (STRINGE *et. al.*, 2003). Este será o ponto de incisão e inoculação dos cisticercos.

A perfuração craniana foi realizada utilizando um micromotor (LB100-Beltec) e broca diamantada (44,5mm x 2 milímetros). A inoculação ocorreu através de uma seringa de 1mL - contendo 3 cisticercos em fase inicial - e uma agulha 25G adaptada (2mm de comprimento) permitiu o alcance dos ventrículos encefálicos. Após os

procedimentos cirúrgicos, as incisões foram fechadas com resina acrílica dental e cola instantânea. Os camundongos controles receberam 10µl de solução fisiológica (MATOS-SILVA *et al.*, 2012). Foram mantidos 5 animais/gaiola (20x30cm) sob iluminação controlada (12/12h), temperatura de 25°C e acesso gratuito ao esterilizados/acidificada água e ração esterilizada. Após a inoculação os animais foram observados por 5 horas no primeiro dia e diariamente até o dia da eutanásia. Cinco animais infectados e cinco controles foram utilizados em cada dia experimental - 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI).

4.2 - Preparo do tecido para quantificação das citocinas *in situ*

Após a eutanásia por deslocamento cervical os encéfalos foram removidos para análise histopatológica, bem como a quantificação de citocinas *in situ* por meio de ELISA e congeladas a -80°C. Após a descongelação, os fragmentos de 100mg de tecido do cérebro foram homogeneizados em 1mL de solução de extracção de citocinas e quimiocinas suplementado com 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 5% de albumina, 0,1mM de cloreto de benzetónio, 10mM de EDTA e 20KIU (Calicreína Unidade de inibidor) de aprotinina. Foi utilizada a razão de 1 mg de tecido para 100 mL de tampão. Após a maceração a amostra foi centrifugada a 10000xg, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi removido para a detecção de citocinas.

4.3 -Análises histopatológicas para avaliação da lesão tecidual *in situ*

Os encéfalos foram removidos e fixados em formaldeído a 10% tamponados por 24 horas, transferidos para etanol a 70% para inclusão em parafina e confecção do bloco, secção de 5µm foi corada com hematoxilina e eosina (HE). A presença de cisticercos, ventriculomegalia e inflamação foram analisadas microscopicamente no tecido do hospedeiro em 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) (LINO Jr *et al.*, 2002). A ventriculomegalia foi analisada de forma semi-quantitativa - ausência (escore 0), discreto (escore 1), moderada (escore 2) e acentuado (escore 3) - Comparação entre o ventrículo infectado e sua não-infectados contralateral do mesmo animal (SHOOK *et al.* 2014).

Os processos patológicos gerais foram analisados no tecido do hospedeiro, aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI) observando: ventriculomegalia, infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, mononucleares, macrófagos

espumosos, meningite, ependimite, microgliose e lesões nas células granulares (células que compõe hipocampo). Os processos patológicos descritos foram classificados de forma semiquantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreto com comprometimento de até 25% da área, moderado de 26 a 50% e acentuado acima de 50% de comprometimento (LINO-Jr, 2002).

4.4 - Análise da desmielinização

De acordo com as alterações observadas nas lâminas coradas pelo HE, realizaram-se colorações especiais em todas as lâminas do grupo infectado e controle.

Para avaliação de desmielinização, as lâminas foram coradas pela técnica de Luxol Fast Blue, segundo protocolo da Mercer University School of Medicine, disponível em <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>.

Para verificação das áreas de desorganização ou lesão axonal, em regiões com desmielinização, foi realizada coloração de Nissl, segundo protocolo da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, disponível em <http://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html>.

A desmielinização foi avaliada qualitativa e semi-quantitativamente, a partir dos seguintes critérios:

- Localização: Periventricular ou parenquimatosa.
- Intensidade (apenas desmielinização periventricular): ausente, discreta (focos de desmielinização), moderada (áreas de desmielinização perfazendo até 50% de região periventricular) e acentuada (áreas de desmielinização perfazendo mais de 50% de região periventricular).
- Distribuição (apenas parenquimatosa): Focal ou difusa.

A desorganização axonal foi avaliada de acordo com disposição das fibras (lamelar ou irradiada)

4.5 - Culturas das células do baço

Após a eutanásia o baço dos animais foram removidos e transferidos para placas de Petri com 2mL de PBS. O órgão foi macerado e as células em suspensão

foram lavadas duas vezes por centrifugação (300xg, 10min, 10°C). As células obtidas foram incubadas com tampão de lise a 37°C, 5 min. Depois o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro de bovino fetal foi adicionado para bloquear a reação. As células foram novamente lavadas duas vezes com meio de cultura RPMI e ressuspendidas. Uma diluição 1/10 azul Tripan foi realizada para permitir a quantificação e análise da viabilidade celular por meio de uma câmara de Neubauer. A concentração das células foram ajustada para 5×10^6 células/ml em meio de cultura de RPMI completo suplementado com soro bovino fetal, 200mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, de 100mg/mL de estreptomicina e 50mM de 2-mercaptoetanol. Um mililitro da suspensão de células do baço foram adicionados a cada poço da placa de 24 poços (Corning-EUA), incubadas com 5µg/ml de concanavalina-A, 36°C em 5% de CO₂ durante 48 horas. Após este período, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para a quantificação de IFN-gama, IL-10, IL-4 e IL-17 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.6 -Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A IL-4, IL-17, IFN-gama e IL-10 foram quantificadas por meio de citocinas através do ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (BD OptEIA™). O anticorpo monoclonal de captura, anti-camundongo IL-4 (Lote: 26389), anti-camundongo IL-10 (Lote: 20169) Set BD OptEIA™ (BD Biosciences, San Diego, CA), anti-camundongo IL-17A (Lote: B167940) ELISA MAX™ (BioLegend) e IFN-gama (5µg/mL do clone XMG 1,2) foram usadas. Estes anticorpos foram fixados em placa de 96 poços e incubados de acordo com as instruções do fabricante. Após este período, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas com tampão PBS/soro bovino albumina 1% (BSA). Depois de um ciclo de lavagem, as amostras e diluições em série das curvas padrões foram adicionadas e incubadas de acordo com as instruções. Foram adicionados os anticorpos anti-citocinas conjugados com biotina e incubados novamente. Depois de um ciclo de lavagem, a estreptoavidina-peroxidase (1: 1000) (BD Pharmingen, EUA) foi adicionado durante um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após outro ciclo de lavagem da TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) foi adicionado até a formação de cor. A reação colorimétrica foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (OD) foi detectada num leitor de microplacas Thermo Labsystems usando dois filtros de 450nm e na 620nm (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As concentrações de citocinas foram determinadas através de uma análise de regressão comparando a absorbância das amostras com os da curva padrão. Os resultados foram expressos em ng/ml.

4.7 - Análises estatísticas

Para a análise estatística das dosagens de citocinas foi elaborado um banco de dados eletrônico. Em seguida, as variáveis foram testadas utilizando o programa Graph Pad 4.0 softwares (GraphPad Inc., USA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste two-way ANOVA, seguido por um pós-teste Bonferroni. Foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

A análise estatística dos processos patológicos gerais foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição fosse considerada normal e variância homogênea foi utilizada testes paramétricos ANOVA. Em casos em que a distribuição não foi normal ou que a variância não fosse homogênea foram utilizados testes não paramétricos Mann Whitney.

As proporções e as correlações também foram avaliadas. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

**RESPOSTA IMUNE CELULAR NA NEUROCISTICERCOSE
INTRAVENTRICULAR EXPERIMENTAL**

**Moura, V. B. L¹; Buzaim, S.L; Matos-Silva, H.; Vinaud, M.C; Loyola, P.R.A.N;
Lino Júnior, R.S.**

**1. Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal
de Goiás – Rua 235 S/N, Setor Universitário, 74605-050. Goiânia, Goiás,
Brazil.**

Resumo

A neurocisticercose (NCC) é considerada uma infecção parasitária negligenciada do sistema nervoso central humano. Esta patogênese é devido a resposta imune do hospedeiro, estágio de evolução e localização do parasito. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune *in situ* e sistêmica através de dosagem de citocinas (IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-gama), bem como a resposta inflamatória local na NCC experimental por *T. crassiceps*. A resposta imune celular e inflamatória *in situ* e sistêmica foram avaliados através da quantificação das citocinas aos 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação e análise histopatológica. Todos os cisticercos foram encontrados dentro dos ventrículos cerebrais. Houve uma discreta intensidade de células inflamatórias do perfil imune misto de polimorfonucleares e mononucleares, no início da infecção e com predominância de células mononucleares no final. Na resposta imune sistêmica mostrou um aumento significativo de todas as citocinas analisadas e predominância das citocinas do perfil imune Th2 no final da infecção. Estes resultados indicam que as localizações dos cisticercos podem levar a ventriculomegalia. A fase aguda da infecção mostrou um perfil imune misto de Th1/Th17 acompanhado por níveis elevados de IL-10, enquanto na fase tardia observou perfil imune Th2.

Palavras-chave: Neurocisticercose; perfil imune; citocinas; inflamação; *Taenia crassiceps*

Introdução

A Neurocisticercose (NCC) é uma infecção do sistema nervoso central (SNC), causado pela forma larval da *Taenia solium*. O SNC é a localização mais frequente e grave deste parasito e a NCC é a infecção parasitária mais comum neste local (FLISSER, 1991; GARCIA & DEL BRUTTO, 2005). A incidência da NCC está aumentando em países desenvolvidos pela imigração de pessoas em áreas endêmicas e devido ao baixo nível socioeconômico dos imigrantes. Esta perspectiva mostra a NCC como uma doença emergente em países como EUA (FLISSER *et al.*, 2003, DEL BRUTTO & GARCIA, 2012; DEL BRUTTO 2014). A NCC é endêmica na América Latina, África Subsaariana, Índia, China e sul da Ásia (GARCIA *et al.* 2014a). No Brasil a incidência da NCC varia de 1,5% em autópsias para 3% em estudos clínicos (TAKAYANAGUI *et al* 1996; AGAPEJEV 2003).

A NCC é uma doença pleomórfica sem predileções para com sexo, raça ou idade. Suas manifestações clínicas dependem de vários fatores, como o tipo morfológico, número, localização e estágio de evolução do parasito, bem como as reações imunopatológicas *in situ* e sistêmica do hospedeiro (SOTELO & MARIN 1987; TAKAYANAGUI 1990, CARABIN *et al.*, 2011, GARCIA *et al.*, 2014A). Estas multiplicidades de fatores conduzem a diversos sinais e sintomas neurológicos, incluindo síndromes neurológicas que variam desde a infecção assintomática à morte súbita. A síndrome neurológica é influenciada pela localização dos cisticercos, que podem estar parenquimal, meningeal, medular, cerebelar e intraventricular (MATUSHITA *et al.*, 2011).

A resposta imune na NCC humana varia desde a ausência completa (assintomática) para uma grave reação inflamatória (sintomática) (DEL BRUTTO *et al.*, 2005). Na maioria dos casos, os parasitos viáveis apresentam pequena inflamação em seu redor que resulta nos casos assintomáticos de NCC. No entanto, a maioria dos casos sintomáticos é caracterizada por uma resposta inflamatória intensa no tecido hospedeiro (CARDONA *et al.*, 2003). A resposta inflamatória pode levar à destruição do parasito e é responsável pelos seus efeitos patológicos, bem como pela sua atividade epileptogênica (NASH *et al.*, 2004; RATHORE & RADHAKRISHNAN, 2012).

A localização dos cisticercos intraventricular e nas meninges são menos frequentes do que a localização no parênquima. No entanto, as manifestações clínicas da cisticercose extra-parenquimatosa são mais agressivas e acontece em cerca de 15a

54% dos pacientes sintomáticos (APUZZO *et al.*, 1984;. Zee *et al.*, 1993, KHADE *et al.*, 2013). O parasito chega aos ventrículos por meio do plexo coróide ocluindo o fluxo do fluido cerebrospinal de forma contínua ou intermitente levando a uma hidrocefalia obstrutiva (APUZZO *et al.*, 1984, KHADE *et al.*, 2013). Sua consequência pode ser morte súbita devido à compressão focal resultando em efeito de massa e distensão do ventrículo. Além da hidrocefalia, pode também observar endodite, aracnoidite basal e edema periventricular, que pode exigir a drenagem do líquido cefalorraquidiano seguido de ressecção dos cisticercos (KELESIDIS e TSODRAS 2012; GARCIA *et al.*, 2014a). A ventriculite é uma das complicações da NCC nos quais requer o implante de shunt que eleva as taxas de mortalidade do paciente (COLLI *et al.*, 1986;. CUETTER & ANDREWS, 2002; GARCIA *et al.*, 2014a).

Para promover melhor compreensão dos fatores envolvidos na patogênese da NCC, dois modelos experimentais foram desenvolvidos, um usando *Mesocostoides Corti* e outro com *Taenia crassiceps* (CARDONA *et al.*, 1999;. MATOS-SILVA *et al.*, 2012).. De acordo com estes modelos, baixas quantidades de parasitos induzem uma resposta imune Th1 inicial, que é capaz de eliminar a infecção (ALVAREZ *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012.). Uma das principais células responsáveis por esta resposta inflamatória são os linfócitos T $\gamma\delta$ (gama-delta) provenientes do perfil Th1, que desempenham um papel importante no desenvolvimento da neuropatologia e da gravidade do NCC (CARDONA *et al.*, 1999;. RESTREPO *et al.*, 2001b). Nos estágios tardios da doença estas células podem conduzir a uma alteração do perfil de macrófagos locais, induzindo a formação de macrófagos alternativamente ativados - AAM ϕ (M2). Estes últimos, por sua vez, apresentam atividade supressiva e são considerados responsáveis pela imunoregulação da resposta inflamatória (TERRAZAS 2008, FREITAS *et al.*, 2012). Estes resultados suportam a hipótese de que os parasitos durante a fase inicial da infecção mantêm um equilíbrio com a resposta imune do hospedeiro que é perdida pela mudança da resposta imunitária para Th2 (REYES *et al.*, 2009).

A patogênese da NCC é limitada pela progressão crônica da doença e também pela influência do tratamento e da resposta imune do hospedeiro complexo. Por conseguinte, o objetivo deste estudo foi elucidar a resposta imune *in situ* e sistêmica através da quantificação de citocinas (IL-4, IL-10, IL-17 e interferon-gama), bem

como a resposta inflamatória local ao longo dos 90 dias da NCC experimental modelo com *T. crassiceps*.

2 - Métodos

2.1- Manutenções dos parasitos

A realização deste projeto obedeceu às normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFG), aprovado e protocolado pelo nº 010/11.

A manutenção da cepa ORF de *Taenia crassiceps*, foi realizada, por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, desde 2002, de acordo com Vaz *et al.* (1997). Esta cepa é mantida no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

2.2 – Infecção

Para a infecção experimental de NCC, utilizou-se camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade (n=40). Após a remoção dos cisticercos de *T. crassiceps* provenientes de camundongos com infecção intraperitoneal de manutenção do parasito, os cisticercos foram lavados duas vezes com PBS, colocados em placa de petri e separados de acordo com o estágio de evolução (VINAUD *et al.*, 2007). Somente os cisticercos no estágio inicial (sem botamentos com líquido translúcido e membrana vesicular) foram selecionados para serem inoculados no SNC dos camundongos. O grupo controle foi inoculado com 10µl de solução fisiológica. Após a anestesia (0,01ml/g de Xilazina a 2% e Ketamina 10%), realizou-se a tricotomia e a anti-sepsia com álcool iodado. Uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo foi realizada para expor a superfície do crânio e para visualização das junções ósseas e o ponto bregma utilizou-se peróxido de hidrogênio a 30%. O animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, onde a torre foi posicionada na vertical com o ponto bregma (angulação zero). Nesta etapa anotam-se os valores dos paquímetros posicionados nos eixos x e y. Para localização exata do ventrículo esses valores serão ajustados (AP-3.0, lateral +2.0) (STRINGE *et al.*, 2003). Este será o ponto de incisão e inoculação dos cisticercos.

A perfuração craniana foi realizada utilizando um micromotor (LB100-Beltec) e broca diamantada (44,5mm x 2 milímetros). A inoculação ocorreu através de uma

seringa de 1mL - contendo 3 cisticercos em fase inicial - e uma agulha 25G adaptada (2mm de comprimento) no qual foi hábil em alcançar os ventrículos encefálicos. Após os procedimentos cirúrgicos, as incisões foram fechadas com resina acrílica dental e cola instantânea. Os camundongos controles receberam 10 µl de solução fisiológica (MATOS-SILVA *et al.* 2012). Foram mantidos 5 animais/gaiola (20x30cm) sob iluminação controlada (12/12h), temperatura de 25°C e acesso gratuito ao esterilizados/acidificada água e ração esterilizada. Após a inoculação os animais foram observados em períodos de uma hora durante o primeiro dia e diariamente depois até ao dia da eutanásia. Cinco animais infectados e cinco controles foram utilizados em cada dia experimental - 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI).

2.3 -Remoção dos encéfalos

Após a eutanásia por deslocamento cervical e o encéfalos foram removidos para análise histopatológica, bem como a quantificação de citocinas *in situ* por meio da técnica de ELISA.

2.4 –Quantificação das citocinas *in situ*

Após a remoção dos encéfalos estes foram congeladas a -80°C. Após a descongelação, os fragmentos de 100mg de tecido do cérebro foram homogeneizados em 1mL de solução de extração de citocinas e quimiocinas suplementado com 0,4 M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 5% de albumina, 0,1mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20 KIU (Calicreína Unidade de inibidor) de aprotinina. Foi utilizada a razão de 1mg de tecido para 100mL de tampão. Após a maceração a amostra foi centrifugada a 10000xg, 10min, 4°C. O sobrenadante foi removido para a detecção de citocinas.

2.5 - Análises histopatológicas para avaliação de lesão tecidual *in situ*

Os encéfalos foram removidos e fixados em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas, transferido para etanol a 70% para inclusão em parafina e confecção do bloco, secção de 5µmfoicorada com hematoxilina e eosina (HE).

A presença dos cisticercos, ventriculomegalia e inflamação foram analisadas microscopicamente no tecido do hospedeiro em 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) (LINO Jr *et al.*, 2002).

A ventriculomegalia foi analisada de forma semi-quantitativa - ausência (escore 0), discreto (escore 1), moderada (escore 2) e acentuado (escore 3) - Comparação entre o ventrículo infectado e o contralateral não-infectado do mesmo animal (SHOOK *et al.*, 2014).

2.6 -Culturas das células do baço

Após a eutanásia o baço dos animais foi removido e transferido para placas de Petri com 2mL de PBS. O órgão foi macerado e as células em suspensão foram lavadas duas vezes por centrifugação (300xg, 10min, 10°C). As células obtidas foram incubadas com tampão de lise a 37°C, 5min. Depois o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro de bovino fetal foi adicionado para bloquear a reação. As células foram novamente lavadas duas vezes com meio de cultura RPMI e ressuspendidas. Uma diluição 1/10 com azul Tripan foi realizada para permitir a quantificação e análise da viabilidade celular por meio de uma câmara de Neubauer. A concentração das células foi ajustada para 5×10^6 células/ml em meio de cultura de RPMI completo suplementado com soro bovino fetal, 200mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, de 100mg/mL de estreptomicina e 50mM de 2- mercaptoetanol. Um mililitro da suspensão de células do baço foi adicionado a cada poço da placa de 24 poços (Corning-EUA), incubadas com 5µg/mL de concanavalina-A, 36°C em 5% de CO₂ durante 48 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a quantificação de IFN-gama, IL-10, IL-4 e IL-17 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

2.7 -Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A IL-4, IL-17, IFN-gama e IL-10 foram quantificadas por meio de citocinas através do ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (BD OptEIA™). O anticorpo monoclonal de captura, anti-camundongo IL-4 (Lote: 26389), anti-camundongo IL-10 (Lote: 20169) Set BD OptEIA™ (BD Biosciences, San Diego, CA), anti-camundongo IL-17A (Lote: B167940) ELISA MAX™ (BioLegend) e IFN-gama (5µg/mL do clone XMG 1,2) foram usadas. Estes anticorpos foram fixados em placa de 96 poços e incubados de acordo com as instruções do fabricante. Após este período, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas com tampão PBS/soro bovino albumina 1% (BSA). Depois de um ciclo de lavagem, as amostras e diluições em série das curvas padrões foram adicionadas e incubadas

de acordo com as instruções. Foram adicionados os anticorpos anti-citocinas conjugados com biotina e incubados novamente. Depois de um ciclo de lavagem, a estreptoavidina-peroxidase (1: 1000) (BD Pharmingen, EUA) foi adicionado durante um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após outro ciclo de lavagem da TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) foi adicionado até a formação de cor. A reação colorimétrica foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (OD) foi detectada num leitor de microplacas Thermo Labsystems usando dois filtros de 450nm e na 620nm (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As concentrações de citocinas foram determinadas através de uma análise de regressão comparando a absorbância das amostras com os da curva padrão. Os resultados foram expressos em ng/ml.

2.8 – Análises Estatísticas

Os resultados dos parâmetros analisados para cada grupo foram determinados pelo teste ANOVA, seguido pelo post-test Bonferrone. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0.05$.

3. - Resultados

3.1 – Descrição e quantificação das citocinas *in situ*

Os encéfalos dos camundongos foram removidos e os cisticercos na fase inicial (sem brotamentos com líquido translúcido e membrana vesicular) foram encontrados em 100% dos ventrículos no grupo dos infectados. Na fase inicial da infecção (7 DAI), foi possível observar o influxo de células inflamatórias compostas tanto por células polimorfonucleares e por células mononucleares no local da inoculação, enquanto nos ventrículos não havia nenhuma inflamação. Em 30 DAI, foi possível observar a infiltração de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares. Aos 60 DAI havia células polimorfonucleares, mas compredominância de células mononucleares no infiltrado inflamatório. Aos 90 DAI, houve predomínio de células mononucleares no infiltrado inflamatório. Além disso, os cisticercos encontrados foram classificados como estágio inicial (sem brotamentos com líquido translúcido e

membrana vesicular) e fase larval (apresentando brotamentos com líquido translúcido e membrana vesicular), sem sinais de degeneração (Figura 1).

O grupo controle, que recebeu a inoculação de PBS, não mostrou ventriculomegalia. A média da análise semiquantitativas da ventriculomegalia nos grupos infectados foi de 30 DAI ($2,4 \pm 0,9$), 60 DAI ($1,2 \pm 1,3$) e 90 DAI ($2,0 \pm 0,7$). Aos 7 DAI o trauma causado pela cirurgia da inoculação dos parasitos não permitiu a observação de ventriculomegalia.

A resposta imune *in situ* foi avaliada através da quantificação dos níveis de citocinas no tecido cerebral durante os dias experimentais (Figura 2). A resposta imune do tipo Th2 foi quantificada através dos níveis de IL-4 ao longo dos dias experimentais (Figura 2A) que mostraram um aumento gradativo durante o experimento ($p > 0,05$).

Para avaliar a resposta imune reguladora os níveis de IL-10 foram quantificados (Figura 2B), nos quais as concentrações foram mais elevadas nas fases iniciais da infecção ($p > 0,05$).

A resposta imune do tipo Th1 foi avaliada através da quantificação de IFN-gama (Figura 2C), que foi mais elevada nas fases iniciais da infecção reduzindo seus níveis na fase tardia da infecção ($p > 0,05$).

A resposta imune Th17 foi quantificado através dos níveis de IL-17 (Figura 2D) não apresentando diferenças estatísticas ao longo dos dias experimentais ($p > 0,05$).

3.2 – Quantificações das citocinas sistêmica

Para avaliar a resposta imune sistêmica dos níveis de citocinas foram quantificadas em culturas de células de baço durante a infecção experimental (Figura 3).

Foi possível observar aumento gradativo nos níveis de IL-4 no grupo infectado, quando comparado ao grupo controle. A partir de 30 DAI ($0,067 \pm 0,10\text{ng/ml}$) até no fim da infecção experimental havia uma diferença significativa nos níveis de citocinas que apresentaram mais elevados ($0,17 \pm 0,01\text{ng/ml}$) aos 90 DAI ($p < 0,05$) (Figura 3A). Não foi possível detectar a presença de IL-4 no grupo controle ao longo do período experimental. O perfil imune regulatório foi determinado através da quantificação dos níveis de IL-10. Nos grupos infectados aos 7 e 30 DAI os níveis de

IL-10 foram de $0,72 \pm 0,24\text{ng/ml}$ e $0,87 \pm 0,13\text{ng/ml}$, respectivamente. Estes resultados foram estatisticamente maiores em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 3B). Os níveis de IL-10 continuaram elevados aos 60 e 90 DAI, apesar de não apresentar significância estatística entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

Foi possível detectar IFN-gama ao longo de todos os dias experimentais com níveis variando de $5,78 \pm 0,91\text{ng/ml}$ para $7,02 \pm 1,52\text{ng/ml}$ (Figura 3C). Só aos 30 DAI, foi observada diferença significativa quando comparado aos grupos controles ($p < 0,05$).

Os níveis de IL-17 apresentaram um comportamento semelhante ao observado nos níveis de IFN-gama. Foram detectados ao longo da infecção, níveis variando entre $0,71 \pm 0,39\text{ng/ml}$ para $1,34 \pm 0,45\text{ng/ml}$ (Figura 3D). Também foi significativamente maior do que os níveis encontrados do grupo controle aos 30 DEEM ($p < 0,05$).

Os camundongos não apresentaram alterações comportamentais durante os dias experimentais.

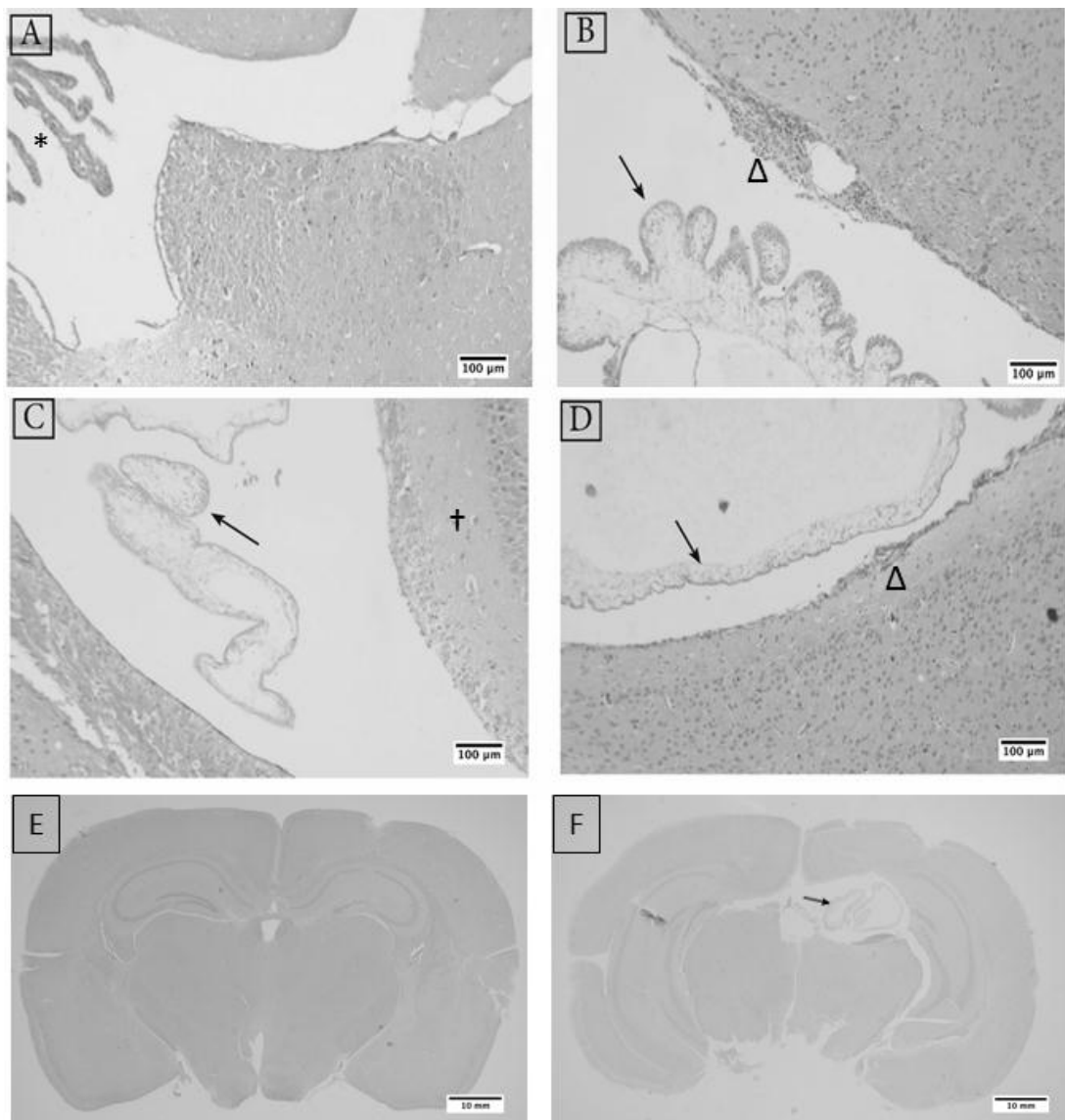


Fig 1: Fotomicrografia dos ventrículos encefálicos de camundongos BALB/c infectados com *Taenia crassiceps*, corados por HE. (A) Ausência de inflamação nos animais inoculados aos 7 DAI, (*) plexo coróide; (B) cisticercos fase inicial (seta) (membrana vesicular sem brotamentos e fluido translúcido) no ventrículo lateral e ependimite discreta (cabeça de seta) em 30 de DAI; (C) cisticercos fase inicial (seta) no ventrículo lateral e gliose discreta (†) aos 60 DAI; (D) cisticercos fase inicial (seta) e ependimite discreta (cabeça de seta) a 90 DAI. Barra de escala - 100µm.

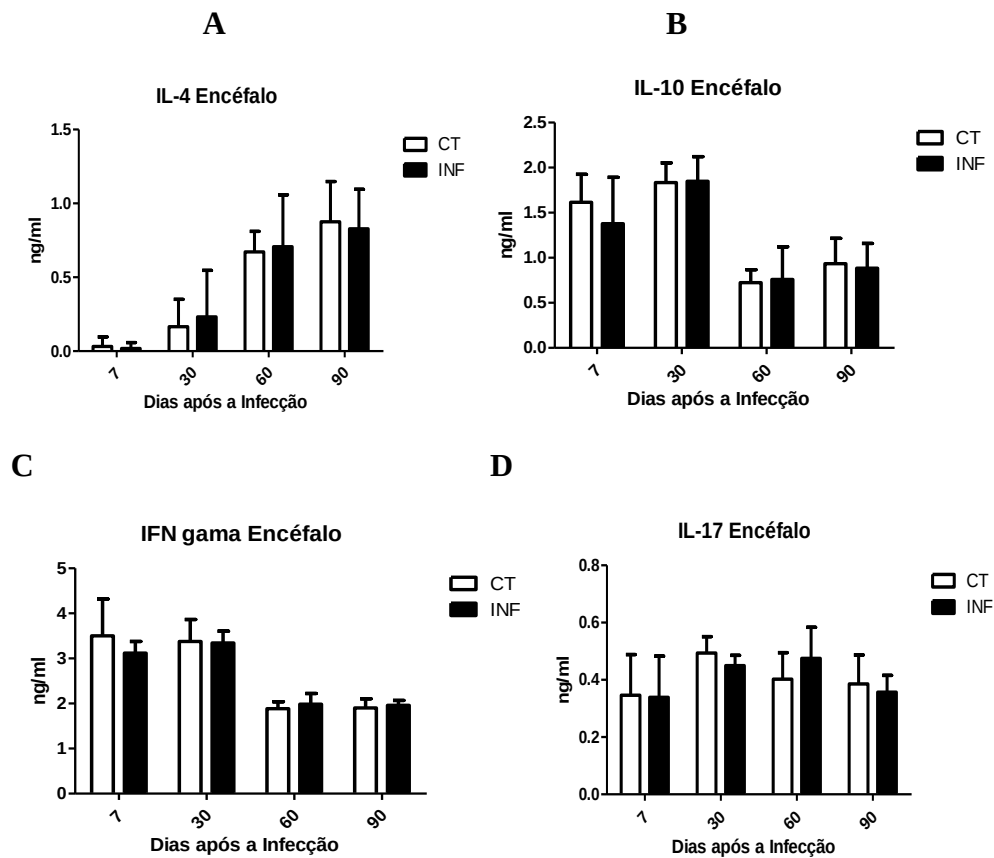


Figura 2: Quantificações de citocinas *in situ* em camundongos BALB/c infectados ou não com *Taenia crassiceps*. (A) Níveis de IL-4 em diferentes dias experimentais; (B) Níveis de IL-10 em diferentes dias experimentais; (C) Níveis de IFN-gama em diferentes dias experimentais; (D) Níveis de IL-17 em diferentes dias experimentais IL-17. Resultados em média $\pm$ desvio padrão dos níveis de citocinas em cada ponto. A análise estatística realizada por meio de análise de variância seguida do teste post-Bonferrone. (n=5 animais em experimentos independentes comparados ao controle). Controle (CT) e Infectado (INF).

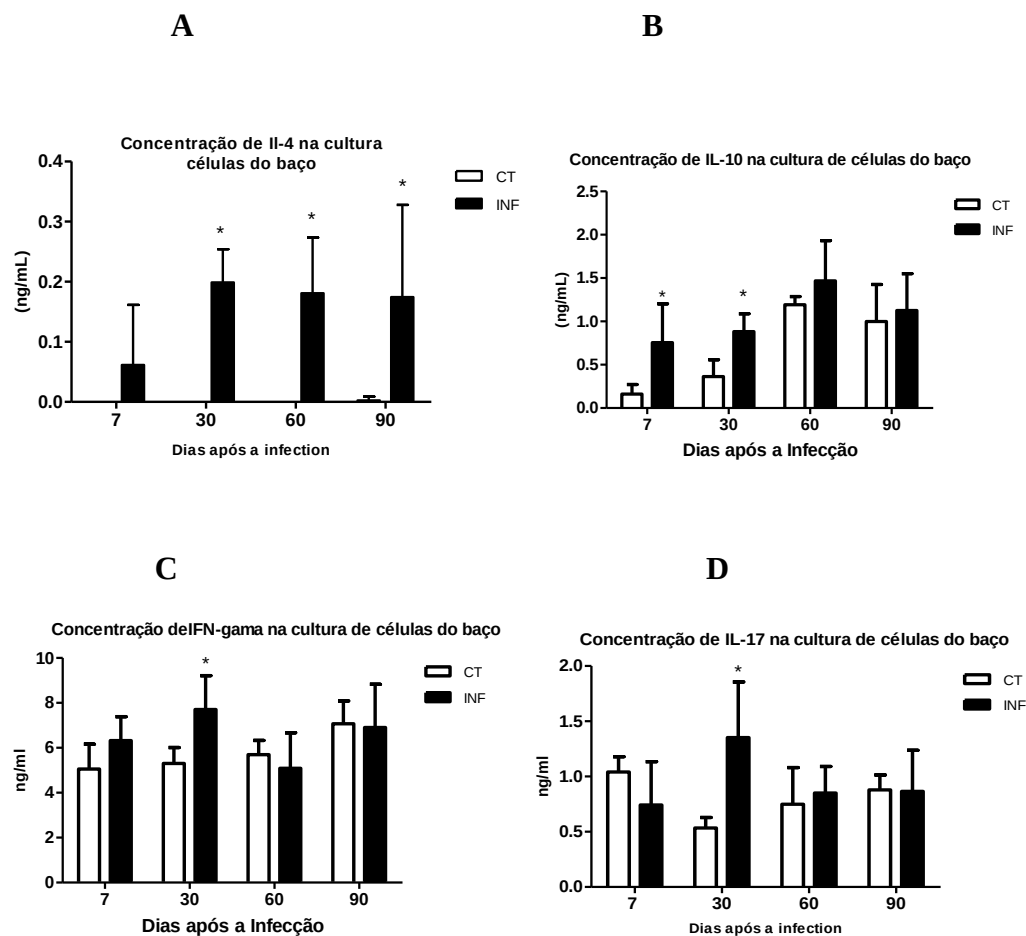


Figura 3: Análise sistêmica das citocinas a partir das células do baço de camundongos BALB/c infectados ou não. (A) Níveis aumentados de IL-4 ao longo da infecção; (B) Altos níveis de IL-10 na fase inicial da infecção; (C) Níveis de IFN-gama com diferença estatística aos 30 DAI; (D) Níveis de IL-17, com diferença estatística aos 30 DAI; Resultados em média $\pm$ desvio-padrão em cada ponto. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido por teste post Bonferroni). (N = 5 animais em experiências independentes comparados ao controle). Controle (CT) e Infectado (INF).

Discussão

Este é o primeiro relato da resposta imune *in situ* e sistêmica da neurocisticercose experimental causada por *T. crassiceps*. Neste estudo, 100% dos cisticercos se apresentavam intraventricularmente. Esta localização da cisticercose é uma causa frequente de hipertensão intracraniana, devido a uma obstrução do fluido cerebrospinal levando ao edema em diferentes graus (APUZZO *et al.*, 1984;.

KHADE *et al.*, 2013). Foi possível detectar as citocinas *in situ*, no entanto, não houve diferença significativa quando comparado com o grupo controle não infectado. Este fato pode ser explicado pela pequena quantidade de células inflamatórias e a análise foi realizada dentro do macerado de cérebro diluindo a quantidade de citocinas produzidas. Além disso, a melhor forma de quantificar as citocinas produzidas na NCC intraventricular seria a partir do fluido cerebrospinal, em camundongos este volume é muito baixo.

A destruição dos cisticercos induz um processo inflamatório intenso que se associa aos sintomas clínicos da NCC, levando à liberação de grandes quantidades de citocinas (SOTELO & MARIN 1987; GARCIA *et al.*, 2014b.). Desta forma, se os cisticercos se encontram viáveis, semelhantes aos encontrados no presente estudo, eles são capazes de modular a resposta imune e inflamatória do hospedeiro resultando na ausência de sintomas, na maioria dos casos (LACLETTE *et al.*, 1990; WHITE *et al.*, 1997; ARECHAVALETA *et al.*, 1998; GOMEZ-GARCIA *et al.*, 2006). Outro fator importante que poderia explicar a não observação de resposta imune *in situ* é que o cérebro é considerado um órgão imune privilegiado, onde as reações inflamatórias e imunológicas são minimizadas evitando danos acentuados no tecido (SOTELO & MARIN, 1987; GARCIA *et al.*, 2014b.).

Apesar de não apresentar uma resposta imunológica *in situ*, os cisticercos foram capazes de induzir ventriculomegalia e ependimite. A NCC meningoencefálica humana apresenta um processo inflamatório semelhante ao encontrado em nosso estudo que leva aos sintomas observados na fase aguda da infecção (MATUSHITA, 2011). Normalmente, as infecções no parênquima levam à epilepsia e um melhor prognóstico do que as infecções extras parenquimatosas, em que o principal sintoma é a hipertensão intracraniana (KHADE *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2014A.). Nos casos de fenômenos obstrutivos observados na NCC intraventricular sintomática, os sintomas começam quando os cisticercos mudam seu estágio de evolução e começam a ser atacados pelo sistema imune levando a um intenso processo inflamatório do epêndima e consequente ependimite, fibrose e estenose secundária do fluido cerebrospinal levando à hidrocefalia e ventriculomegalia (SOTELO & MARIN, 1987; KELESIDIS & TSIODRAS, 2012; KHADE *et al.*, 2013).

Vários estudos têm sido realizados visando a caracterização das respostas imune e inflamatórias e suas variações de acordo com o estágio de evolução e morfologia do parasito (CARDONA *et al.*, 1999; CARDONA *et al.*, 2002; KHADE

et al., 2013;. GARCIA *et al.*,2014a). A resposta imune se comporta de maneira diferente quando avaliadas *in situ* ou sistêmica sobre células periféricas (RESTREPO *et al.*, 2001a;. SÁENZ *et al.*, 2012). Isto está de acordo com os resultados deste estudo, no qual foi possível detectar diferenças entre as respostas *in situ* e sistêmica. Outros estudos também observaram um aumento nos níveis de citocinas como IL-5, IL-6 e IL-10 em pacientes NCC com sintomatologia ativa em comparação com pacientes assintomáticos ou controles de líquido cefalorraquidiano (EVANS *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2000; AGUILAR-REBOLLEDO *et al.*, 2001; CHAVARRIA *et al.*, 2006). Na avaliação sistêmica da resposta imune no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígenos de cisticercos retirados de pacientes assintomáticos de NCC foi observado níveis aumentados de citocinas Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-13 (CHAVARRIA *et al.* 2005; CHAVARRÍA *et al.*, 2006; SÁENZ *et al.*, 2012). Estes resultados estão de acordo com as conclusões deste estudo, no qual o tipo de resposta imune encontrado é baseado no perfil imune Th2 reforçando que este é um bom modelo experimental para estudos de imunopatologia da NCC.

Neste estudo foi possível observar que os cisticercos intraventriculares, provavelmente induziram ruptura da barreira hematoencefálica permitindo o influxo de células inflamatórias desde o início da infecção. O conjunto de células inflamatórias em torno dos cisticercos em locais extra parenquimatosos, incluindo meninge e ventrículos foram relatados anteriormente e estão de acordo com o nosso estudo (CARDONA *et al.*, 1999). Estes autores também encontraram uma resposta imune inicial Th1 na NCC experimental causada por *M. Corti*, mas, diferentemente de nossos achados, não houve alteração na resposta imune local, provavelmente devido à localização cisticercos.

A resposta imune sistêmica foi inicialmente regulada pela presença de IL-10, que é capaz de modular os mediadores imunes através das micróglias e células gliais residentes que levam à redução da liberação de citocinas pro-inflamatórias (SCIUTTO *et al.*, 2007;. TERRAZAS *et al.*, 2008). Além disso, a IL-10 capaz de ativar os linfócitos T regulatórios diminuindo o dano tecidual (TERRAZAS *et al.*, 2008). Aos 30 DAI foi possível observar aumento da resposta imune com a presença de todos os perfis analisados. Apesar da presença de IFN-gama e IL-17, o parasito foi capaz de modular a resposta imune em autobenefício favorecendo a sua sobrevivência através da indução de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e

IL-4. O IFN-gama pertence ao perfil imune do tipo Th1, que está relacionado com a sintomatologia grave e lesão tecidual e é regulada pela citocina IL-10, o qual modula a resposta imune e os danos ao tecido (TERRAZAS *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 2000;. CARDONA e TEALE 2002; CHAVARRIA *et al.*, 2003; CHAVARRIA *et al.*, 2005; SCIUTTO *et al.*, 2007).

Curiosamente a cisticercose experimental intraperitoneal mostra um perfil imune Th1 inicial através da quantificação das citocinas séricas que inibe um perfil imune Th2 humoral (RESTREPO *et al.*, 2001a; CARDONA & Teale, 2002; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TOENJES & KUHN 2003) e está associada com a destruição do parasito (TERRAZAS *et al.*, 1998;. ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007). Esta resposta imune Th1 inicial é capaz de induzir macrófagos classicamente ativados (CMø ou M1), que são responsáveis pela eliminação dos parasitos através da liberação de óxido nítrico (NO). O NO também contribui para a morte de vários agentes patogênicos extracelulares, tais como na infecção intraperitoneal de *T. crassiceps* (ALONSO- TRUJILLO *et al.*, 2007), bem como agentes patogênicos intracelulares (GAZZINELLI *et al.*, 1998; GORDON, 2003).

Simultaneamente, foi também possível detectar IL-4, que é uma citocina do perfil imune Th2 que atua em congruência com IL-10, minimizando os danos aos tecidos, mas incapaz de favorecer a proliferação do parasito através da ativação de macrófagos M2. Também elevados níveis de IL-17, citocina pró-inflamatória foi detectada. Esta citocina recruta neutrófilos para o local da infecção e está envolvida em doenças inflamatórias crônicas. Quando é liberada em excesso permite danos teciduais e doenças autoimunes. As células Th17 foram descritas no SNC e conduzem à inflamação e lesão tecidual (LANGRISH *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005). Por outro lado, o bloqueio da IL-17 é eficaz na prevenção da erosão do osso e cartilagem e, consequentemente, reduz os sintomas clínicos da artrite reumatóide (LUBBERTS *et al.*, 2004). A IL-17 pode atuar como alvo terapêutico em doenças inflamatórias do SNC, tais como na NCC, pois os anticorpos humanizados anti-IL17A, já está sendo utilizados contra doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide, psoríase e uveíte (GENOVESSE *et al.*, 2010; HUEBER *et al.*, 2010).

Neste estudo foi possível observar que à medida que a infecção progride, há uma conversão do perfil imune para o tipo Th2. Esta mudança de perfil favorece a proliferação do parasito nas infecções crônicas (TERRAZAS *et al.*, 1998; TOENJES *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002;. TOENJES & KUHN, 2003).

Resultado semelhante foi relatado por Moura *et al.*, (2013), que avaliou o perfil de macrófagos intraperitoneais M2 após cisticercose experimental intraperitoneal e concluiu que esta resposta favoreceu a proliferação do parasito. Além disso, este perfil foi observado por outros autores (TERRAZAS *et al.*, 1998; TOENJES *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TOENJES & KUHN, 2003).

Uns dos prováveis mecanismos responsáveis por esta alteração do perfil imunológico durante o NCC experimental é que os parasitos têm a capacidade de libertar glicoproteínas que são responsáveis pelo aumento da secreção de IL-4 ou IL-13. Outra hipótese é que o tegumento do parasitoé coberto com glicoproteínas ou glicoconjugados (GCs) que são altamente antigênicos capazes de modular a resposta imune do hospedeiro (WHITE *et al.*, 1997). MENDLOVIC *et al.*, (2015) relataram que uma calreticulina de *T. solium* é capaz de induzir resposta imune do tipo Th2 em teníase experimental em hamsters mostrando que o parasito é hábil em secretar agentes imunomoduladores.

Portanto conclui-se que a presença dos cisticercos dentro dos ventrículos induz ventriculomegalia durante o período experimental. Também a resposta imune sistêmica observada através do perfil imune misto pró-inflamatória Th1/Th17 na fase aguda da infecção, acompanhado por níveis elevados de IL-10. Com a progressão da infecção houve predominância do perfil imune Th2.

APOIO FINANCEIRO: Os autores gostariam de agradecer ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Referências

- Aguilar-Rebolledo, F., Cedillo-Rivera, R., Llaguno-Violante, P., Torres-López, J., Muñoz-Hernández, O., Enciso-Moreno, J. A.** (2001). Interleukin levels in cerebrospinal fluid from children with neurocysticercosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **64**(1–2), 35–40.
- Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoya, I., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L.I.** (2007). Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology Research* **100**(6), 1341-1350. doi: 10.1007/s00436-006-0424-4
- Alvarez, J. I., Mishra, B. B., Gundra, U. M., Mishra, P. K., Teale, J. M.** (2010). *Mesocostoidescorti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* **137**(3), 359-372. doi: 10.1017/S0031182009991971.
- Agapejev, S.** (2003). Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach. *Arquivos de Neuropsiquiatria* **61**(3B), 822-828. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2003000500022>

- Apuzzo, M. L. J., Dobkin, W. R., Zee, C. S., Chan, J. C., Giannotta, S. L., Weiss, M. H.** (1984). Surgical considerations in the treatment of intraventricular neurocysticercosis: an analysis of 45 cases. *Journal of Neurosurgery* **60**(2), 400-407.
- Arechavaleta, F., Molinari, J. L., Tato, P.** (1998). A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitology Research* **84**(2), 117-122.
- Carabin, H., Ndimubanzi, P. C., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y., Cowan, L. D., Stoner, J. A., Rainwater, E., Dickey, M.** (2011). Clinical Manifestations Associated with Neurocysticercosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**(5), e1152. doi:10.1371/journal.pntd.0001152
- Cardona, A. E., Gonzalez, P. A., Teale, J.M.** (2003). CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma-delta T cells in amplification of the host immune response. *Infection and Immunity* **71**(5), 2634-2642. doi:10.1128/IAI.71.5.2634-2642.2003
- Cardona, A. E., Restrepo, B. I., Jaramillo, J. M., Teale, J. M.** (1999). Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *Journal of Immunology* **162**(2), 995-1002.
- Cardona, A. E., Teale, J. M.** (2002). Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *Journal of Immunology* **169**(3), 3163-3171.
- Chavarria, A., Fleury, A., Bobes, R. J., Morales, J., Fragoso, G., Sciutto, E.** (2006) A depressed peripheral cellular immune response is related with symptomatic neurocysticercosis. *Microbes and Infection* **8**(4), 1082-1089. doi:10.1016/j.micinf.2005.11.005
- Chavarría, A., Fleury, A., Garcia, E., Marquez, C., Fragoso, G., Sciutto, E.** (2005) Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology* **116**(3), 271-278. doi:10.1016/j.clim.2005.04.008
- Chavarría, A., Roger, B., Fragoso, G., Tapia, G., Fleury, A., Dumas, M., Dessein, A., Larralde, C., Sciutto, E.** (2003) TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection* **5**(12), 1109-1115. doi:10.1016/S1286-4579(03)00206-5
- Colli, B. O., Martelli, N., Assirati, J. A. Jr., Machado, H. R., de Vergueiro, F. S.** (1986) Results of surgical treatment of neurocysticercosis in 69 cases. *Journal of Neurosurgery* **65**(3), 309-315.
- Cuetter, A. C., Andrews, R. J.** (2002). Intraventricular neurocysticercosis: 18 consecutive patients and review of the literature. *Neurosurgical Focus* **12**(6), e5.
- Del Brutto, O. H., García, H. H.** (2012). Neurocysticercosis in Nonendemic Countries: Time for a Reappraisal. *Neuroepidemiology* **39**(2), 145-146. doi:10.1159/000341693
- Del Brutto, O. H., Santibanez, R., Idrovo, L., Rodriguez, S., Diaz-Calderon, E., Navas, C., Gilman, R. H., Cuesta, F., Mosquera, A., Gonzalez, A. E., Tsang, V. C., Garcia, H. H.** (2005). Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador. *Epilepsia* **46**(4), 583-587. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.36504.x
- Del Brutto, O. H.** (2014). Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist* **4**(4), 205-212. doi: 10.1177/1941874414533351.

- Evans, C. A., Garcia, H. H., Hartnell, A., Gilman, R. H., Jose, P. J., Martinez, M., Remick, D.G., Williams, T. J., Friedland, J. S. (1998) Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infection and Immunity* **66**(9), 4522–4525.
- Flisser, A., Sarti, E., Lightowlers, M., Schantz, P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica* **87**(1), 43-51. doi:10.1016/S0001-706X(03)00054-8
- Flisser, A. (1991). Taeniasis-cysticercosis: an introduction. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **22**, 233-235.
- Freitas, A. A., Moura, V. B., Gonçalves, S. F., Rodrigues, A. A., Félix, R. M., Soares, T. P., Irusta, V. R., Vinaud, M. C., Oliveira, M. A., Lino, R. S. Jr. (2012) Kinetics of the inflammatory response in subcutaneous cysticercosis induced in mice by *Taenia crassiceps*. *Journal of Comparative Pathology* **147**(2-3), 267-274. doi: 10.1016/j.jcpa.2011.12.009.
- García, H. H., Del Brutto, O. H. (2005). Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *The Lancet Neurology* **4**(10), 653-661. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70194-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70194-0)
- Garcia, H. H., Nash, T. E., Del Brutto, O. H. (2014a). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology* **13**(12), 1202-1215. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
- Garcia, H. H., Rodriguez, S., Friedland, J. S. (2014b). Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunology* **36**(8), 388-396. doi: 10.1111/pim.12126.
- Gazzinelli, R. T., Talvani, A., Camargo, M. M., Santiago, H. C., Oliveira, M. A., Vieira, L. Q., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Silva, J. S. (1998). Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**(1), 89-104.
- Genovesse, M. C., Van Den Bosch, F., Robertson, S. A., Bojin, I. M., Ryan, P., Sloan-Lancaster, J. (2010). LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis and Rheumatism* **62**(4), 929–939. doi: 10.1002/art.27334.
- Gomez-Garcia, L., Rivera-Montoya, I., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L. I. (2006). Carbohydrate components of *Taenia crassiceps*, metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research* **99**(4), 440-448. doi: 10.1007/s00436-006-0159-2
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **3**(1), 23-35. doi:10.1038/nri978
- Hueber, W., Patel, D. D., Dryja, T., Wright, A. M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M. H., Psoriasis Study Group, Durez, P., Tak, P. P., Gomez-Reino, J. J., Rheumatoid Arthritis Study Group, Foster, C. S., Kim, R. Y., Samson, C. M., Falk, N. S., Chu, D. S., Callanan, D., Nguyen, Q. D.; Uveitis Study Group, Rose, K., Haider, A., Di Padova, F. (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Science Translational Medicine* **2**(52), 52ra72. doi: 10.1126/scitranslmed.3001107
- Kelesidis, T., Tsiodras, S. (2012) Extraparenchymal neurocysticercosis in the United States. *The American Journal of the Medical Sciences* **344**(1), 79–82. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823e6565.

- Khade, P., Lemos, R. S., Toussaint, L. G.** (2013). What is the utility of postoperative antihelminthic therapy after resection for intraventricular neurocysticercosis? *World Neurosurgery*. **79**(3-4), 558-567. doi: 10.1016/j.wneu.2011.05.053.
- Laclette, J. P., Merchant, M. T., Damian, R. T., Willms, K.** (1990). Crystals of virus-like particles in the metacestodes of *Taeniasolium* and *T. crassiceps*. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**(2), 215-221. doi:10.1016/0022-2011(90)90103-D
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Cua, D. J.** (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **201**(2), 233-240. doi: 10.1084/jem.20041257
- Lino-JR, R. S., Ribeiro, P. M., Antonelli, E. J., Faleiros, A. C., Terra, S. A., Reis, M. A., Teixeira, V. P. A.** (2002). Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **35**, 617-622.
- Lubberts, E., Koenders, M. I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C. J., Joosten, L. A., van den Berg, W. B.** (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis and Rheumatism* **50**(2), 650-659. doi: 10.1002/art.20001
- Matos-Silva, H., Reciputti, B. P., Paula, E. C., Oliveira, A. L., Moura, V. B. L., Vinaud, M. C., Oliveira, M. A. P., Lino-Júnior, R. S.** (2012). Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arquivos de Neuropsiquiatria* **70**(4), 287-292. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2012005000010>
- Matushita, H., Pinto, F. C., Cardeal, D. D., Teixeira, M. J.** (2011). Hydrocephalus in neurocysticercosis. *Childs Nervous System* **27**(10), 1709-1721, 2011 doi: 10.1007/s00381-011-1500-3.
- Mendlovic, F., Cruz-Rivera, M., Avila, G., Vaughan, G., Flisser, A.** (2015). Cytokine, antibody and proliferative responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. *PLoS One* **10**(3), e 0121321. doi: 10.1371/journal.pone.0121321.
- Moura, V. B. L., Silva, M. M., Batista, L. F., Gomes, C. M., Leenen, P. J. M., Lino-Jr, R. S., Oliveira, M. A. P.** (2013). Arginase activity is associated with fibrosis in experimental infection with *Taenia crassiceps*, but does not play a major role in resistance to infection. *Experimental Parasitology* **135**(3), 599-605. doi: 10.1016/j.exppara.2013.09.014.
- Nash, T. E., Del Brutto, O. H., Butman, J. A., Corona, T., Delgado-Escueta, A., Duron, R. M., Evans, C. A., Gilman, R. H., Gonzalez, A. E., Loeb, J. A., Medina, M. T., Pietsch-Escueta, S., Pretell, E. J., Takayanagui, O. M., Theodore, W., Tsang, V. C., Garcia, H. H.** (2004). Calcific neurocysticercosis and epileptogenesis. *Neurology* **62**(11), 1934-1938.
- Oliveira, M. A. P., Santiago, H. C., Lisboa, C. R., Ceravollo, I. P., Trinchieri, G., Gazinelli, R. T., Vieira, L. Q.** (2000). *Leishmania* sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL12 and IFN- γ synthesis. *Experimental Parasitology* **95**(2), 96-105. doi:10.1006/expr.2000.4523
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C.** (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* **6**(11), 1133-1141. doi:10.1038/ni1261

- Rathore, C., Radhakrishnan, K.** (2012). What causes seizures in patients with calcified neurocysticercal lesions. *Neurology* **78**(9), 612-613. doi: 10.1212/WNL.0b013e318248df75.
- Restrepo, B. I., Aguilar, M. I., Melby, P. C., Teale, J. M.** (2001a). Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**(4), 366–370.
- Restrepo, B. I., Alvarez, J. I., Castano, J. A., Arias, L. F., Restrepo, M., Trujillo, J., Colegial, C. H., Teale, J. M.** (2001b). Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infection and Immunity* **69**(7), 4554–4560. doi:10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001
- Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., Terrazas, L. I.** (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **9**(6), 1115-1127. doi: 10.1016/j.meegid.2009.05.011.
- Rodrigues, V. Jr., De-Mello, F. A., Magalhaes, E. P., Ribeiro, S. B., Marquez, J. O.** (2000) Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**(9), 1059–1063. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000000900011>
- Rodriguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I.** (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of Immunology* **168**(7), 3135-3139. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3135
- Sáenz, B., Fleury, A., Chavarria, A., Hernández, M., Crispin, J. C., Vargas-Rojas, M. I., Fragoso, G., Sciutto, E.** (2012). Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. *Medical Microbiology and Immunology* **201**(1), 73-80. doi: 10.1007/s00430-011-0207-0.
- Sciutto, E., Chavarria, A., Fragoso, G., Fleury, A., Larralde, C.** (2007). The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology* **29**(12), 621-636. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00967.x
- Shook, B. A., Lenington, J. B., Acabchuk, R. L., Halling, M., Sun, Y., Peters, J., Wu, Q., Mahajan, A., Fellows, D. W., Conover J. C.** (2014). Ventriculomegaly associated with ependymal gliosis and declines in barrier integrity in the aging of human and mouse brain. *Aging cell* **13**, 340-350. Doi: 10.1111/accel.12184
- Sotelo, J., Marin, C.** (1987) Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. *Journal of Neurosurgery* **66**(5), 686–689. doi:10.3171/jns.1987.66.5.0686.
- Takayanagui, O. M.** (1990) Neurocysticercosis. I. Clinical and laboratory course of 151 cases. *Arquivos de Neuropsiquiatria* **48**(1), 1–10
- Takayanagui, O. M., Castro e Silva, A. A., Santiago, R. C., Odashima, N. S., Terra, V. C., Takayanagui, A. M.** (1996) Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirao Preto-SP, Brazil. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. **54**(4), 557–564.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C.** (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology* **84**(1), 74-81.
- Terrazas, L. I.** (2008). The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **8**(5), .383-392. doi: 10.2174/156802608783790848

- Toenjes, S. A., Kuhn, R. E.** (2003). The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. *Parasitology Research* **89**(5), 407-413.
- Toenjes, S. A., Spolski, R. J., Mooney, K. A., Kuhn, R. E.** (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* **118**(6), 623-33.
- Vaz, A. J., Nunes, C. M., Piazza, R. M., Livramento, J. A., da Silva, M. V., Nakamura, P. M., Ferreira, A. W.** (1997). Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**(3), 354-357.
- Vinaud, M. C., Lino Junior, R. S., Bezerra, J. C. B.** (2007). *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Experimental Parasitology* **116**(4), 335-339. doi:10.1016/j.exppara.2007.01.013
- White, A. C. Jr., Robinson, P., Kuhn, R.** (1997) *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chemical Immunology* **66**, 209–230.
- Zee, C. S., Segall, H. D., Destian, S., Ahmadi, J., Apuzzo, M. L.** (1993). MRI of intraventricular cysticercosis: surgical implications. *Journal of Computer Assisted Tomography* **17**(6), 932–939.

Artigo 2

DESMIELINIZAÇÃO NA NEUROCISTICERCOSE INTRAVENTRICULAR EXPERIMENTAL

Moura, V. B. L¹; Buzaim, S.L; Silva, H. M; Vinaud, M.C; Sugita, D. M.; Lino Júnior, R.S.

2. Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás – Rua 235 S/N, Setor Universitário, 74605-050. Goiânia, Goiás, Brazil.

Resumo

A neurocisticercose (NCC) é a infecção parasitária mais comum e mais grave do sistema nervoso central (SNC) humano, acometendo grande número de pessoas produzindo, algumas vezes, sintomatologia grave, que se associam a lesões acentuadas. Estas lesões na NCC, ainda não são totalmente esclarecidas e parece ter uma estreita relação com o estágio, com a localização, o número dos parasitos, como também com a resposta imune do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi avaliar e caracterizar as células inflamatórias e outros processos patológicos gerais como também as lesões teciduais pela quantificação das áreas de desmielinização ao longo da infecção experimental de NCC intraventricular.

Nos primeiros dias de infecção foram observadas poucas alterações patológicas gerais que podem ter provocado a ruptura da barreira hemato encefálica permitindo o influxo de células inflamatórias. Aos 30 DAI observa-se ventriculomegalia, presença de processo inflamatório misto, além de grande quantidade de macrófagos espumosos. Em 100% dos animais analisados apresentavam desmielinização periventricular. No final da infecção, observou-se ventriculomegalia moderada, processo inflamatório predominantemente de mononucleares e macrófagos espumosos que foram capazes em alterar o processo de desmielinização periventricular para parenquimal. Em conclusão, as células inflamatórias e ao efeito de massa provocado pelo parasito intraventricular são capazes em promover desmielinização periventricular inicial e parenquimal no final da infecção.

Palavras-chave: neurocisticercose intraventricular, desmielinização periventricular, desmielinização parenquimal.

ABSTRACT

The neurocysticercosis (NCC) is the most common and severe parasitic infection of human central nervous system (CNS) that involve large number of people producing sometimes-severe symptoms, which are associated with marked clinical symptoms and lesions. These lesions in the NCC still unclear and seems to have a close relationship with the stadium, with the location, the number of parasites, as well as the host immune response. This study aimed to characterize the inflammatory cells and tissue injury by analyzing the periventricular parenchymal and demyelination along the experimental infection of intraventricular NCC. Initially, few changes are observed, such as influx of inflammatory cells possibly by altering brain barrier. With the progress of infection is observed ventriculomegaly, mixed inflammatory process and presence of foamy macrophages. The presence of inflammatory cells is associated with neurodegeneration observed by areas of demyelination were more frequent periventricular. At the end of the infection, ventriculomegaly and predominance of mononuclear with the presence of foamy macrophages alter the pattern of demyelination passing be observed more frequently in the parenchyma. In conclusion, it is observed that the inflammatory cells are able to promote demyelination periventricular start and at the end of parenchymal infection.

Keywords: demyelination parenchymal, periventricular demyelination, neurocysticercosis.

INTRODUÇÃO

A Neurocisticercose (NCC) é a infecção parasitária mais comum e mais grave do sistema nervoso central (SNC) humano (COULDWELL & APUZZO 1992; FLISSER, 1991; SCHENONE *et al.*, 1982), acometendo grande número de pessoas produzindo algumas vezes sintomatologia grave (FLISSER, 1991). A prevalência está relacionada com os fatores socioeconômico-culturais, representando importante problema de saúde pública pela deficiência de condições sanitárias, ou em países, que recebem imigrantes de áreas endêmicas (AGAPEJEV, 2003; FLISSER *et al.*, 2003). No Brasil a incidência da NCC em autópsia é até 1,5% e em estudos clínicos até 3% (TAKAYANAGUI *et al.*, 2001; AGAPEJEV, 2003). São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo são considerados áreas endêmicas (AGAPEJEV, 2003).

A NCC é classificada por diferentes parâmetros como pelas localizações anatômicas (parenquimal, subaracnóidea, intraventricular e espinhal ou medular), sintomatológicas (distúrbios mentais, síndromes localizadas, aumento da pressão intracraniana e síndrome da pressão medular), nas imagenológicas (formas ativa e inativa) e relacionadas ao prognóstico (formas benignas ou malignas) (PITTELLA, 1997, AGAPEJEV, 2003). Além disso, os cisticercos podem ser vistos em diferentes estágios de maturação, dependendo das propriedades nutricionais do lugar (MÁRQUEZ-MONTER, 1972; FLISSER *et al.*, 1982).

Após implantação dos cisticercos, há influxo de células inflamatórias que se diferem de acordo com a localização dos cistos. Nos ventrículos, determinam obstrução dos canais do fluxo liquórico (NEVES, 2003; SOTELO *et al.*, 2002), podendo ocasionar hidrocefalia, normalmente associada à hipertensão intracraniana, cefaléia, reações inflamatórias, epilepsia, acidente vascular cerebral e compressão radicular, apresentando ou não fibrose (BENEDETI *et al.*, 2007).

Pittella (1997) descreveu mudanças do infiltrado inflamatório em relação com o estágio de desenvolvimento do parasito. Na fase vesicular pouca ou nenhuma inflamação e em fase de destruição intenso infiltrado inflamatório composto de linfócitos, células multinucleadas e macrófagos espumosos. Macrófagos espumosos são células de citoplasma abundante, com inúmeros vacúolos pequenos opticamente vazios, que dão ao citoplasma aparência de espuma (COTRAN *et al.*, 1999). O papel dos macrófagos espumosos é controverso, mas são responsáveis pela fagocitose das

membranas de células destruídas, acumulando colesterol em seu interior, por isso são denominados espumosos. Para isso, envolve a síntese de novo colesterol, com entrada acelerada e efluxo reduzido. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que LDL oxidado induz mais eficientemente a formação dessas células, que o LDL normal (SONG *et al.*, 2001).

As doenças inflamatórias desmielinizantes idiopáticas do (SNC) constituem um grupo heterogêneo de alterações que diferem no seu curso clínico, patologia e imunopatogênese. Apesar das amplas diferenças reconhecidas entre si, estas doenças são caracterizadas pela inflamação do SNC, desmielinização e perda axonal variável (LASSMANN, 2007), podendo ocorrer em duas fases distintas, uma inicial caracterizada pelo processo inflamatório, e outra neurodegenerativa progressiva (STEINMAN, 2001). Há evidências substanciais de que o estresse oxidativo gerado na inflamação pode ser causador, ou, pelo menos, um fator auxiliar na patogenia das principais doenças neurodegenerativas (UTTARA, SINGH *et al.*, 2009; FERRETTI & BACCHETTI, 2011; OLIVEIRA, KALLAUR *et al.*, 2012). A desmielinização pode ser induzida por fatores solúveis produzidos pelas células inflamatórias que se difundem no parênquima de forma direta ou por meio da ativação da micróglia (LASSMANN & LUCCHINETTI, 2008). Ainda pouco se sabe sobre esse processo na NCC.

Os modelos experimentais têm sido útil no entendimento da fisiopatologia de várias doenças. Atualmente existem quatro modelos experimentais diferentes para NCC. Os primeiros estudos foram realizados por pesquisadores nos EUA utilizando camundongos BALB/c fêmeas, inoculados com *Mesocostoides corti* (CARDONA *et al.*, 1999). O segundo grupo realizado no Brasil utilizando também camundongos de duas linhagens BALB/c e C57BL/6 inoculados com cisticercos de *T. crassiceps* (MATOS-SILVA *et al.*, 2012). Mais recentemente no Peru e no México, desenvolveram modelo em ratos (VERASTEGUI *et al.*, 2015) e em suínos jovens (FLEURY *et al.*, 2015), respectivamente utilizando cistos (oncosferas ativas) de *T. solium*.

O primeiro grupo observou acúmulo de parasitos e células inflamatórias em áreas extraparenquimatosas, apresentando resposta imune inicial Th1 e Th2 no final com destruição dos parasitos (CARDONA *et al.*, 1999; SCIUTTO *et al.*, 2007). A partir daí surge a ideia que os parasitos mantêm equilíbrio com a resposta imune inicial, e

ao longo do tempo esse equilíbrio é perdido pela mudança da resposta e destruição dos mesmos.

Existem várias hipóteses para explicar a relação entre a inflamação e desmielinização, tema este muito abordado em outras doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla, e pouco explorado na NCC. Na perspectiva de analisar esse processo, utilizou-se o modelo experimental de NCC com cisticercos viáveis de *T. crassiceps* para avaliar a influência das células inflamatórias desencadeando desmielinização ao longo do tempo.

2 - Materiais e Métodos

A realização deste estudo obedeceu às normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFG), aprovado e protocolado pelo nº 010/11.

A manutenção da cepa ORF de *Taenia crassiceps*, foi realizada, por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, desde 2002, de acordo com Vaz *et al.* (1997). Esta cepa é mantida no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

2.1 – Infecção

Para a infecção experimental de NCC, foi utilizado camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade (n=40). Sendo 20 animais do grupo controle e 20 do grupo infectados em 4 dias experimentais. Após a remoção dos cisticercos de *T. crassiceps* provenientes de camundongos com infecção intraperitoneal de manutenção do parasito, os cisticercos foram lavados 2 vezes com PBS, colocados em placa de petri e separados de acordo com o estágio de evolução (VINAUD *et al.*, 2007). Somente os cisticercos no estágio inicial (sem botamentos com líquido translúcido e membrana vesicular) foram seleccionados para serem inoculados no SNC dos camundongos. O grupo controle foi inoculado com 10µl de solução fisiológica.

Após a anestesia (0,01ml/g de Xilazina a 2% e Ketamina 10%), realizou-se a tricotomia e a anti-sepsia com álcool iodado. Uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo foi realizada para expor a superfície do crânio e para visualização das junções ósseas e o ponto bregma utilizou-se peróxido de hidrogênio a 30%. O

animal foi posicionado no aparelho estereotáxico, onde a torre foi posicionada na vertical com o ponto bregma (angulação zero), anotando-se os valores dos paquímetros posicionados nos eixos x e y. Para localização exata do ventrículo esses valores serão ajustados (AP-3.0, lateral +2.0) (STRINGE *et. al.*, 2003). Este será o ponto de incisão e inoculação dos cisticercos como também de PBS para delineamento do grupo controle.

A perfuração craniana foi realizada utilizando um micromotor (LB100-Beltec) e broca diamantada (44,5mm x 2 milímetros). A inoculação ocorreu através de uma seringa de 1mL - contendo 3 cisticercos em fase inicial - e uma agulha 25G adaptada (2mm de comprimento) permitiu o alcance dos ventrículos encefálicos. Após os procedimentos cirúrgicos, as incisões foram fechadas com resina acrílica dental e cola instantânea. Os camundongos controles receberam 10µl de solução fisiológica (MATOS-SILVA *et al.* 2012). Foram mantidos 5 animais/gaiola (20x30cm) sob iluminação controlada (12/12h), temperatura de 25°C e acesso gratuito ao esterilizados/acidificada água e ração esterilizada. Após a inoculação os animais foram observados em períodos de uma hora durante o primeiro dia e diariamente depois até ao dia da eutanásia. Cinco animais infectados e cinco controles foram utilizados em cada dia experimental - 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI).

2.2 - Análises histopatológicas para avaliação de lesão tecidual in situ

Após a eutanásia por deslocamento cervical e o encéfalos foram removidos para análise histopatológica. Para esta análise os encéfalos foram fixados em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas, transferido para etanol a 70% para inclusão em parafina e confecção do bloco. A secção da lâmina foi de 5µm posteriormente corada com hematoxilina e eosina (HE) e colorações especiais.

Os processos patológicos gerais foram analisados no tecido do hospedeiro, aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI) observando: ventriculomegalia, infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, mononucleares, macrófagos espumosos, meningite, ependimite, microgliose e lesões nas células granulares (células que compõe hipocampo). Os processos patológicos descritos foram classificados de forma semiquantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreto com comprometimento de até 25% da área, moderado de 26 a 50% e acentuado acima de 50% de comprometimento (MATOS-SILVA *et al.*, 2012).

Comparação entre o ventrículo infectado e sua não-infectados contralateral do mesmo animal (SHOOK *et al.*, 2014).

2.3 - Análises da desmielinização

De acordo com as alterações observadas nas lâminas coradas pelo HE, realizaram-se colorações especiais em todas as lâminas do grupo infectado e controle.

Para avaliação de desmielinização, as lâminas foram coradas pela técnica de Luxol Fast Blue, segundo protocolo da Mercer University School of Medicine, disponível em <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>.

Para verificação das áreas de desorganização, foi realizada coloração de Nissl, segundo protocolo da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, disponível em <http://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html>.

A desmielinização foi avaliada qualitativa e semiquantitativamente, a partir dos seguintes critérios:

- Localização: Periventricular ou parenquimatosa.
- Intensidade (apenas desmielinização periventricular): ausente, discreta (focos de desmielinização), moderada (áreas de desmielinização perfazendo até 50% de região periventricular) e acentuada (áreas de desmielinização perfazendo mais de 50% de região periventricular).
- Distribuição (apenas parenquimatosa): Focal ou difusa.

2.5 - Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Stat 3.5. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição não normal, as variáveis foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os processos patológicos foram classificados de forma semiquantitativa, enumerando-os, onde o ausente foi considerado pelo número zero (0), o discreto pelo número um (1), com comprometimento de até 25% da área afetada, moderado pelo número um (2), as alterações entre 26 a 50% e o acentuado pelo número um (3), correspondia a alterações acima de 50% de comprometimento. A partir daí fez-se a média e desvio padrão das somatórias das alterações observadas pelo grupo experimental. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

Todos os cisticercos observados neste experimento foram localizados nos ventrículos cerebrais, provocando inflamação, expansão da cavidade ventricular e em alguns casos desvio da linha média do hipocampo.

Os resultados descritos abaixo estão apresentados na tabela 1, tabela 2, figura 1 e 2.

Aos 7 DAI, embora observou-se influxo de células inflamatórias de mononucleares (MN) nos dois grupos analisados essa diferença não foi significativa (Tabela 1). Nos dois grupos analisados não observou desmielinização neste dia experimental (Tabela 2). Aos 30 DAI, observaram-se alterações somente nos animais infectados como, ventriculomegalia, processo inflamatório misto, com presença de PMN e MN e presença de macrófagos espumosos (Tabela 1; Figura 1). A desmielinização periventricular foi discreta em 100% (n=5) dos animais analisados e somente 40% dos animais apresentaram desmielinização parenquimal focal (Tabela 2; Figura 2).

Aos 60 DAI, observou-se perfil de células inflamatórias de PMN no local da infecção e dispersão de células hipocampais em 80% de forma moderada no grupo infectado (Tabela 1; Figura 1). A desmielinização periventricular foi observada em 80% dos casos analisados, sendo 20% (n=1) discreta e 60% (n=3) moderada. A desmielinização parenquimal só foi observada em 20% dos casos de forma focal (Tabela 2; Figura 2).

Aos 90 DAI, a ventriculomegalia, ependimite, células mononucleares, macrófagos espumosos, meninge e ependimite, foram estatisticamente maior nos animais infectados em relação ao controle (Tabela 1; figura 1). A desmielinização periventricular só foi observada em 40% dos animais analisados se dividindo em discreta e moderada e 80% apresentavam desmielinização parenquimal focal (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 1. Análise dos processos patológicos gerais nos encéfalos de camundongos BALB/c fêmeas infectadas intracranialmente com cisticercos viáveis de *Taenia crassiceps*.

Alterações microscópicas	BALB/c Controle (n=5)		BALB/c Infectado(n=5)	
	DAI	% (n)	% (n)	P
Ventriculo megalia	7	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	30	0 (±0)	2,4 (±0,894427)	$p = 0,008$
	60	0,6 (±0,547723)	1,2 (±1,30384)	$p > 0,05$
	90	0 (±0)	2 (±0,707107)	$p = 0,008$
Infiltrado Inflamatório (PMN)	7	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	30	0 (±0)	1,4 (±0,547723)	$p = 0,008$
	60	0 (±0)	0,2 (±0,447214)	$p = 0,05$
	90	0,2 (±0,447214)	0,8 (±0,83666)	$p > 0,05$
Infiltrado Inflamatório (MN)	7	1 (±0)	1,2 (±0,83666)	$p > 0,05$
	30	0,8 (±0,447214)	2 (±0)	$p = 0,008$
	60	0,4 (±0,547723)	1,2 (±0,83666)	$p > 0,05$
	90	0,2 (±0,447214)	2 (±0,707107)	$p = 0,008$
Macrófagos Espumosos	7	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	30	0 (±0)	1 (±0)	$p = 0,008$
	60	0 (±0)	0,4 (±0,547723)	$p > 0,05$
	90	0 (±0)	0,8 (±0,447214)	$p = 0,032$
Meningite	7	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	30	0,2 (±0,447214)	0,4 (±0,547723)	$p > 0,05$
	60	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	90	0 (±0)	1 (±0)	$p = 0,008$
Ependimite	7	0 (±0)	0 (±0)	$p > 0,05$
	30	0,2 (±0,447214)	1 (±1)	$p > 0,05$
	60	0,4 (±0,547723)	0,2 (±0,447214)	$p > 0,05$
	90	0 (±0)	1 (±0,707107)	$p = 0,032$
Gliose	7	1 (±0)	0,6 (±0,547723)	$P = 0,310$
	30	0 (±0)	0,6 (±0,894427)	$P = 0,310$
	60	0,6 (±0,547723)	1,2 (±1,30384)	$p = 0,548$
	90	0,4 (±0,547723)	0 (±0)	$P = 0,310$
Lesão hipocampal	7	1,6 (±0,547723)	1 (±0)	$p > 0,05$
	30	0,6 (±0,894427)	1,8 (±0,83666)	$p > 0,05$
	60	1 (±0,707107)	2,2 (±0,447214)	$p = 0,032$
	90	1,4 (±0,547723)	1,8 (±0,83666)	$p > 0,05$

Observações: DAI – Dias após a infecção; MN–Mononuclear; PMN –

Tabela 2. Análise da desmielinização nos encéfalos de camundongos BALB/c fêmeas infectadas intracranialmente com cisticercos viáveis de *Taenia crassiceps*.

Desmielinização	Periventricular	Parenquimal
Controles	100% ausente	100% ausente
7 DAI	100% ausente	100% ausente
30 DAI	100% discreto	40% focal
60 DAI	20% discreto 60% moderado	20% focal
90 DAI	20% discreto 20% moderado	80% focal

Observações: DAI – Dias após a inoculação.

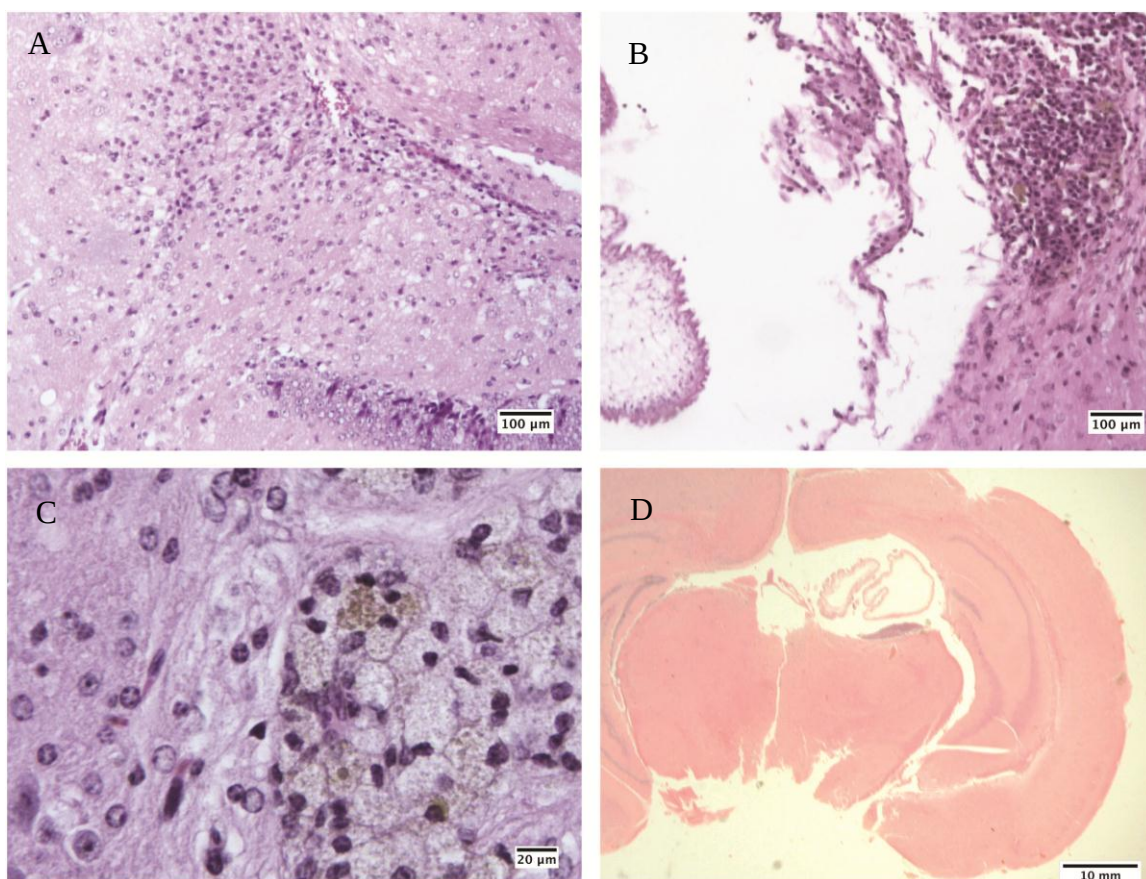


Figura 1 - Fotomicrografia de encéfalos de animais infectados ou não com cisticercos de *T. crassiceps*. Em (A) observa-se alterações nas células gliais no grupo controle. Em (B) animais infectados mostrando cisticercos no ventrículo e processo inflamatório. Em (C) presença de macrófagos espumosos em animais infectados e em (D) ventriculomegalia e cisticercos. Coloração H.E. Escala = 100μm.

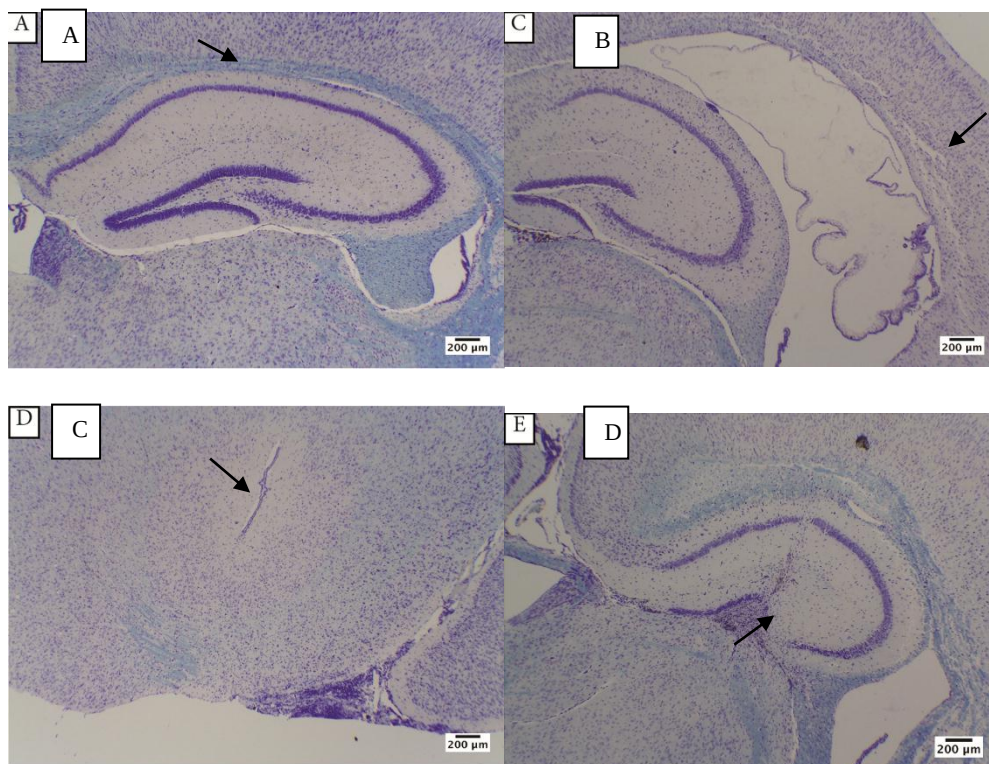


Figura 2: Fotomicrografia de encéfalos dos animais controles e infectados com cisticercos viáveis de *T. crassiceps* intraventricular. Em (A) observa-se o padrão normal de mielinização em forma laminar, como mostrado na seta. Em (B) observa-se ventriculomegalia acentuada devido ao efeito de massa, provando isquemia e desmielinização no parênquima adjacente. Em (C) área de desmielinização parênquimal devido à presença de foco inflamatório. Em (D) área de desmielinização, mostrada na seta associada à perda das células do hipocampo. Coloração Luxol Fast Blue, Escala = 200µm.

Discussão

Este é o primeiro estudo de alterações nos padrões normais de mielina provocando desmielinização periventricular e parênquimal na NCC intraventricular experimental causada por cisticercos de *T. crassiceps*. Neste estudo, 100% dos cisticercos se localizavam dentro dos ventrículos, podendo causar hipertensão intracraniana, devido à obstrução do fluido cerebrospinal levando a graus diferenciados de edema (APUZZO *et al.*, 1984;. KHADE *et al* 2013). Inicialmente observa-se influxo de células inflamatórias nos dois grupos analisados, embora sem diferenças significativas, fato este que pode ter sido provocado pelo procedimento cirúrgico e a implantação dos cisticercos. O influxo de células inflamatórias pode estar correlacionado com a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), queé formada pela presença das junções endoteliais que controlam a abertura e fechamento

coordenado das junções célula-célula (STAMATOVIC *et al.*, 2008). A BHE é um importante componente da rede de comunicação que conecta o sistema nervoso central e os tecidos periféricos, além disso funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central. (BANKS, 2010). Esse trânsito de células e moléculas contribui na geração ou progressão de várias doenças inflamatórias e neurodegenerativas no encéfalo (BROOKS *et al.*, 2005; OTTO *et al.*, 2002; YATSIV *et al.*, 2002; FUKUDA *et al.*, 2013; RIGAU *et al.*, 2007).

Observamos também alteração nas células gliais, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos analisados, perfazendo-se 100% no grupo controle e 60% no grupo infectado. Sabe-se que as células gliais (astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimais) apresentam funções além de suporte aos neurônios, podem alterar diretamente a comunicação entre os mesmos, pois estão em contato próximo com a rede neuronal, adquirindo funções como: captação e liberação de neurotransmissores, controle do metabolismo iônico e produção de fatores neurotróficos (KIMELBERG *et al.*, 1989). Foi descrito por Bernardinelli *et al.*, (2004), se as células gliais sofrerem alterações, liberam Ca^{+2} , que resultam em morte de neurônios pela deficiência na utilização e captação da glicose do meio. Estes resultados corroboram com o presente estudo, devido ao processo cirúrgico provocou alterações nas células gliais que podem mudar sua morfologia e funções induzindo a inflamação (BAKER & MANUELIDIS, 2003), observada nos dias subsequentes.

Aos 30 DAI, observa-se ventriculomegalia, presença de PMN e mononucleares (MN) e grandes quantidades de macrófagos espumosos que podem interferir na resposta imune do hospedeiro. Os macrófagos espumosos em resposta a microrganismos produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e fator transformador do crescimento beta ($TGF\beta$) (BANGERT *et al.*, 2011). Estes corpúsculos lipídicos no interior desses macrófagos estão relacionados às diversas condições inflamatórias, podendo funcionar como sítios de armazenamento e síntese de mediadores inflamatórios (eicosanóides) (MELO *et al.*, 2011; MELO & DVORAK, 2012), contribuindo para lesão tecidual exacerbada. De forma geral a neurodegeneração mediada pela inflamação envolve ativação de células como macrófagos residentes no encéfalo (microglia), capazes de liberarem fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides que podem lesar neurônios e células gliais (WYSS-CORA, *et al.*

2002), como também degradação de colágeno, elastina e fibrina induzindo neurodegeneração (POPOVICH *et al.*, 1999; 2001; 2002). Além dos macrófagos residentes, os neutrófilos como também os macrófagos derivados de monócitos da corrente sanguínea podem induzir neurodegeneração (POPOVICH *et al.*, 1999; 2001; 2002). As micróglia são ativadas precocemente e podem contribuir para o início do processo lesivo no SNC (GOMES-LEAL, 2002). Acredita-se que macrófagos e micróglia ativados possam contribuir para exacerbação da lesão no SNC durante condições patológicas neurais (SCHNELL *et al.*, 1999; POPOVICH *et al.*, 1999; CARLSON, *et al.*, 1998). Além disso, o parasito pode ainda dificultar a ativação do sistema imune pela mudança de antígenos de superfície, pois estes podem capturar lipídeos por fontes exógenas (destruição de membranas celulares) e após a absorção, rapidamente incorporam esses lipídeos à sua membrana cística e ao tegumento (KÖHLER *et al.*, 1988).

Neste mesmo dia experimental observa-se também PMNs ativados no local da infecção produzindo quimiocinas e citocinas quimioatraentes a diversos tipos celulares, além de ser a primeira linha de defesa tanto em tecidos neurais como em tecidos não neurais contra microrganismos (BANGERT *et al.*, 2011; SERHAN *et al.*, 2007), contribuindo para o agravamento do processo lesivo. Todavia a relação entre inflamação e neurodegeneração tem sido pouco explorada na NCC e os mecanismos de ação e suas interferências têm sido objeto de investigações. Pouco se sabe sobre desmielinização na NCC, mas por analogia com outras doenças neurodegenerativas são caracterizadas primeiramente pela infiltração de células da periferia para o SNC, e normalmente são predominantemente de mononucleares. Também são encontrados altos níveis de anticorpos e frações do complemento podendo levar a destruição direta da bainha de mielina como também a morte de oligodendrócitos (BOMPRESZI *et al.*, 2011). Foi observado por Peterson e colaboradores (2007) que a desmielinização é resultado de ativação de micróglia com perda axonal de forma direta. No presente estudo avaliou-se a perda dos padrões normais da mielina apresentando desmielinização periventricular em 100% dos casos analisados e 40% parenquimal focal. Estudos corroboram com estes resultados, pois os mecanismos inflamatórios e o estresse oxidativo gerado na inflamação podem ser causa ou um fator auxiliar na patogenia das principais doenças neurodegenerativas (UTTARA, SINGH *et al.*, 2009; FERRETTI E BACCHETTI, 2011; OLIVEIRA, KALLAUR *et al.*, 2012).

No final da infecção, observou-se ventriculomegalia moderada, ependimite, meningite e presença de macrófagos espumosos. O processo inflamatório nesta fase foi predominantemente de MN diferentemente do início da infecção. Esta modificação do perfil inflamatório ocorre devido à habilidade inerente do parasito e seus antígenos em modular a resposta imune, por meio de moléculas secretadas/excretadas, ou por meio da variabilidade antigênica, facilitando a evasão da resposta imune, pois são dinamicamente responsáveis as mudanças ambientais do hospedeiro (WHITE *et al.*, 1997; MAIZELS *et al.*, 1993). Outro mecanismo de escape consiste em favorecer macrófagos alternativamente ativados (AAMo ou M2), que auxiliam na proliferação do parasito (RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002; TERRAZAS *et al.*, 1998; TOENJES *et al.*, 1999).

Já foram descritos na literatura que as doenças neurodegenerativas são capazes de provocar processos desmielinizantes no SNC (BOMPRESZI & CAMPAGNOLO, 2007; PETERSON *et al.*, 2007). Na NCC este processo desmielinizantes ainda não relatados, mas agora observado através do nosso estudo experimental, onde avaliamos os padrões normais de mielina e suas alterações ao longo do período experimental. Essas alterações nos padrões normais de mielina só foram observadas a partir dos 30 DAI em 100% dos animais analisados em áreas próximas ao ventrículo, local de implantação dos cisticercos. Já na fase final da infecção a desmielinização se localizava em sua maioria no parênquima encéfalico. A mudança de localização de áreas de desmielinização podem apresentar duas causas distintas e associadas; na fase inicial a desmielinização operiventricular observada pode ter causa inflamatória em áreas próximas ao foco inflamatório enquanto no final da infecção além da inflamação persistente observa-se o aumento do volume do cisticerco comprimindo estruturas adjacentes dificultando a circulação local, neste caso levaria a desmielinização no parênquima pelo efeito de massa do parasito.

Alguns trabalhos corroboram com o presente estudo, pelo fato do processo inflamatório ser causa de lesão tecidual e processos neurodegenerativos como a desmielinização. Juntamente com o processo inflamatório o estresse oxidativo gerado pode provocar a destruição da bainha de mielina e liberação de suas proteínas. O estudo da presença de proteínas provenientes da destruição da bainha foi analisado no CSF em uma infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis* (LIN *et al.*, 2010), confirmando que o processo inflamatório pode ser considerado como causa secundária de desmielinização no SNC. Foi demonstrado na infecção

experimental de NCC o aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que auxilia na manutenção da inflamação (FLEURY *et al.*, 2015; VERASTEGUI *et al.*, 2015). O VEGF é uma citocina potente e multifuncional que atua por meio dos receptores expressos no endotélio vascular causando aumento da permeabilidade vascular e estímulo à neovascularização em processos fisiológicos e patológicos (DVORAK *et al.*, 1995), consequentemente levando a exacerbação da lesão tecidual e desmielinização.

Além da inflamação persistente devemos considerar o efeito de massa do parasito comprimindo estruturas encéfalicas reduzindo significativamente o fluxo sanguíneo na área isquêmica central, que leva a alterações nos processos metabólicos, no suprimento energético da célula e na homeostase iônica, gerando perda da integridade celular, por necrose e apoptose em poucos minutos (LIPTON, 1999; SACCCO, 2002; MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004). Esse processo pode levar a neurodegeneração causando desmielinização no SNC, e a extensão destas áreas depende da intensidade e duração da exposição. A compressão de estruturas levando à isquemia também foi relatada em muitos casos de neuralgia trigeminal, devido à compressão da artéria ou veia adjacente, perto da zona de entrada da raiz nervosa, produzindo uma região focal de desmielinização por processo não inflamatório (LOVE *et al.*, 2006). Processos desmielinizantes também foram relatados em outras doenças neurodegenerativas como na EM (LASSMANN & LUCCHINETTI, 2008), contudo na NCC ainda é obscuro.

No presente estudo observou-se predomínio de células mononucleares no final da infecção experimental de NCC que está de acordo com os outros trabalhos experimentais de NCC (CARDONA *et al.*, 1999; MATOS-SILVA *et al.*, 2012; VERASTEGUI *et al.*, 2015; FLEURY *et al.*, 2015). Acredita-se que os linfócitos T γ δ são os principais responsáveis pela patogênese na NCC, pois são capazes de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias desencadeando lesão tecidual intensa (TERRAZAS *et al.*, 2008; CARDONA *et al.*, 1999). E a importância dos macrófagos que podem estar envolvidos na destruição tecidual como também no reparo e regeneração, mas que no SNC a atividade destas células seria inibida por um ambiente hostil à regeneração (Schwartz *et al.*, 2001).

A importância no reconhecimento de todas as eventuais lesões teciduais provocadas pela presença do parasito como também do processo inflamatório aliado ao um diagnóstico precoce pode prevenir a neurodegeneração. Os modelos

experimentais vêm auxiliando muito na investigação desta patogênese permitindo estudo de novas terapias na tentativa de reduzir as incapacidades residuais melhorando a qualidade de vida dos pacientes com NCC.

Conclui-se que, a NCC em fase inicial, provocou ventriculomegalia, influxo de células inflamatórias e lesões teciduais como desmielinização periventricular. Na fase tardia, observou-se desmielinização parenquimal em sua maioria, que pode ter sido provocada pelo processo inflamatório constituído de mononucleares e pelo efeito de massa do parasito comprimindo estruturas encefálicas provocando desmielinização hipóxico-isquêmica.

REFERÊNCIAS:

- AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. 61(3B), 2003, pp.822-828.
- APUZZO ML, DOBKIN WR, ZEE CS, CHAN JC, GIANNOTTA SL, WEISS MH. Considerações cirúrgicas no tratamento da cisticercose intraventricular. Uma análise de 45 casos. **J Neurosurg**. 1984 Feb; 60 (2): 400-7.
- BAKER, C. A. ; MARTIN D.; MANUELIDIS, L. Microglia de Brains Creutzfeldt-Jakob Disease-infectados são Infeciosas e Mostrar mRNA específico de perfis de ativação. **J Virol**. 2002 novembro, 76 (21): 10.905-10.913.
- BANGERT, C.; BRUNNER, P.M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**. 2011, v. 29, pp. 360–376.
- BANKS WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. **Forum Nutr**. 2010, 63:102-10. Review.
- BENEDETI MR, FALAVIGNA, DLM, FALAVIGNA-GUILHERME AL, ARAÚJO SM. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com NCC atendidos no Hospital Universitário Regional de Maringá, Paraná, Brasil. **Arq Neuropsiquiatr**, 2007, 65, pp.124-9.
- BERNARDINELLI, Y.; MAGISTRETTI, P.J.; CHATTON, J.Y. Astrocytes generate Na⁺ mediated metabolic waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, pp.14937-14942.
- BOMPRESZI R, POSTEVKA E, CAMPAGNOLO D, VOLLMER TL. A review of cases of neuromyelitis optica. **Neurologist**. 2011, Mar. 17(2):98-104.
- BROOKS, T.A.; HAWKINS, B.T.; HUBER, R.D.; EGLETON, R.D. AND DAVIS, D.T.P. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol**. 2005, pp. 289:H743.
- CARDONA, A.E.; RESTREPO, B.I.; JARAMILLO, J.M.; TEALE, J.M. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. **J. Immunol**. 1999, 162, pp.995-1002.

CARLSON, S.L.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J .E.; DOTY,K.; DOSSETT, L. Acute Inflammatory Respon Spinal Cord Following Impact Injury. **Experimental Neurology**.1998, 151:77-88.

COULDWELL, W.T., APUZZO, M.L.J. Cysticercosis cerebri. **Neurosurg Clin North Am**. 1992, v.3, n.2, pp.471-481.

DVORAK HF, BROWN LF, DETMAR M, DVORAK AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**. 1995,146(5): 1029-39.

FERRETTI G1, BACCHETTI T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis.**J Neurol Sci**. 2011 Dec, 15;311(1-2):92-7.

FLEURY, A.; TREJO, A.; CISNEROS, H.; GARCÍA-NAVARRETE, R.; VILLALOBOS, N.; HERNÁNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, J.V.; HERNÁNDEZ, B. ROSAS, G.; BOBES, R.J.; ALUJA, A. S.; SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G. Taenia solium: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2015, 10.1371.

FLISSER A et al. Cysticercosis Present State of knowledge and Perspectives, **New York: Academic Press**. 1982.

FLISSER, A. et al. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica**, Mexico, DF, 2003, 87, pp.43-51.

FLISSER, A. Taeniasis-cysticercosis: an introduction Southeast Asian. **J Trop Med Public Health**,1991, 22, pp.233-5.

FUKUDA AM, ADAMI A, POP V, BELLONE JA, COATS JS, HARTMAN RE, ASHWAL S, OBENAU A, BADAUT J: Posttraumatic reduction of edema with aquaporin-4 RNA interference improves acute and chronic functional recovery. **J Cereb Blood Flow Metab** 2013, 33:1621e1632

FUKUDA S.; OHNEDA Ó; OSHIKA T. O stress oxidativo retarda o desenvolvimento vascular antes de degeneração neuronal em ratos ocorre degeneração da retina RD1. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. 2014 Mar, 252 (3): 411-6.

GOMES-LEAL, W. Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal. 2002. 197f. Tese (Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.

KHADE P, LEMOS RS, TOUSSAINT LG. Qual é a utilidade da terapia anti-helmíntico pós-operatório de ressecção para neurocisticercose intraventricular? **World Neurosurg**. 2013 Mar-Apr,79(3-4):558-67.

KIMELBERG HK, NORENBURG MD. Astrocytes. **Sci Am**. 1989 Apr., 260(4):66-72, 74, 76.

KÖHLER, P.; VOIGT, W. P. Nutrition and Metabolism. In: MELHORN, H. **Parasitology in focus: facts and trends**. Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 1988. p. 412-453.

LASSMANN, H; LUCCHINETTI CF.Cortical demyelination in CNS inflammatory demyelinating diseases. **Neurology**. 2008 Jan, 29, 70(5):332-3.

LASSMANN, H. Multiple sclerosis: is there neurodegeneration independent from inflammation? **J Neurol Sci**. 2007 Aug 15;259(1-2):3-6.

LIN, K.Y; CHEN, K.M.; LAN, K.P.; LEE, H.H.LAI, S.C. Alterations of myelin proteins in inflammatory demyelination of BALB/c mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **Elsevier** 2010.

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Ver*. 1999, 79(4):1432-568.

LINO-JR, R. S., RIBEIRO, P. M., ANTONELLI, E. J., FALEIROS A. C., TERRA, S. A., REIS, M. A. E TEIXEIRA, V. P. A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. *Rev Soc Bras Med Trop*; 35, 2002, pp.617-622.

LOVE S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol*. 2006 Nov. 59(11):1151-9.

MAIZELS, R. M., BUNDY, D. A., SELKIRK, M. E., SMITH, D. F. AND ANDERSON, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*. 1993, 365, pp.797–805.

MARQUÉZ-MONTER H. Patologia de la cisticercosis. *Gaceta Medica de Mexico* 1972, 103, pp.230-242.

MATOS-SILVA, H.; RECIPUTTI, B.P.; PAULA, E.C.; OLIVEIRA, A.L.; MOURA, V.B.L.; VINAUD, M.C.; OLIVEIRA, M.A.P.; LINO-JÚNIOR, R.S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. Current imaging techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*. 2011, v.59, n.5, pp. 540–56.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*. 2011, v.59, n.5, pp. 540–56.

MELO, R.C.N.; DVORAK, A.M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathogens*. 2012, v. 8, n. 7, pp.1-13.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*. 2004 Dec;19(3-4):151-67.

NEUMANN H, SCHMIDT H, WILHARM E, BEHRENS L, WEKERLE H. Interferon γ gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J. Exp. Med*. 1997, 186:2023–2031. [PubMed:9396771]

NEVES DP. *Parasitologia Dinâmica*. São Paulo: Editora Atheneu 2003, 474p.

OLIVEIRA SR; KALLAUR AP; SIMÃO AN; MORIMOTO HK; LOPES J; PANIS C; PETENUCCI DL; DA SILVA E; CECCHINI R; KAIMEN-MACIEL DR; REICHE EM. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci*. 2012 Oct, 15;321(1-2):49-53.

OTTO VI, GLOOR SM, FRENTZEL S, GILLI U, AMMANN E, HEIN AE, FOLKERS G, TRENTZ O, KOSSMANN T, MORGANTI-KOSSMANN MC. The production of macrophage inflammatory protein-2 induced by soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes is mediated by src tyrosine kinases and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem*. 2002 Mar, 80(5):824-34.

OWENS T. The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Curr.Opin.Neurol*. 2003,16:259–265. [PubMed: 12858060]

PETERSON, LK; FUJINAMI, RS. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2007 Mar, 184(1-2):37-44.

PITELLA, J.E.H. Neurocysticercosis. *Brain Pathology*. 1997, v. 7, pp. 681-693.

POPOVICH, P.G.; GUAN, Z.; WEI, P.; HUITLNGA, I.; VAN ROOIJEN, N.; STOKES, B. T. Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. *Experimental Neurolog*. 1999; 158:351-365.

POPOVICH, P.G.; HICKEY, W.F. Bone Marrow Chimeric Rats Reveal The Unique Distribution of Resident Recruited Macrophages in the Contused Rat Spinal Cord. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. 2001; 60:676-685. 11.

POPOVICH, P.G; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W.F.; BASSO, D.M. The Neuropathological and Behavioral Consequences of Intraspinal Microglia1/Macrophage Activation. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. 2002; 61:623-633.

RIGAU V, MORIN M, ROUSSET MC, DE BOCK F, LEBRUN A, COUBES P, PICOT MC, BALDY-MOULINIER M, BOCKAERT J, CRESPEL A, LERNER-NATOLI M: Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. **Brain** 2007, 130:1942e1956

RODRIGUEZ-SOSA M, DAVID JR, BOJALIL R, SATOSKAR AR, AND TERRAZAS LI. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. **J Immunol**. 2002, 168: 3135-3139.

SCHENONE H, VIILAROEL F, ROJAS A RAMIREZ R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: Flisser A et al. eds. Cysticercosis Present State of Knowledge and Perspectives, **New York: Academic Press**. 1982, 25-38.

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

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E.; PERRY, V.H. Acute Inflammatory Responses to Mechanical Lesions in the Cns: Differences between Brain and Spinal Cord. **European Journal of Neuroscience**. 1999; 11:3648-3658.

SCHWARTZ, M.; MOALEM, G. Beneficial Immune Activity after Cns Injury: Prospects for Vaccination. **Journal of Neuroimmunology**. 2001, 113:185-192

SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**. 2007, 25:101-37.

SHOOK BA1, LENNINGTON JB, ACABCHUK RL, HALLING M, SUN Y, PETERS J, WU Q, MAHAJAN A, FELLOWS DW, CONOVER JC. Ventriculomegaly associated with ependymal gliosis and declines in barrier integrity in the aging human and mouse brain. **Aging Cell**. 2014 Apr, 13(2):340-50.

SONG, L.; LEUNG, C.; SCHINDLER, C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, New York. 2001, v. 108, pp.251-259.

SOTELO J, DEL BRUTTO OH. Review of neurocysticercosis. **Neurosurg Focus**. 2002;12:1–6.<http://www.neurosurgery.org/focus/jun02/12-6-nsf-zoc.html>. [PubMed].

STAMATOVIC SM, KEEP RF, ANDJELKOVIC AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. **Curr Neuropharmacol**. 2008; 6(3):179-92.

STEINMAN, L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. **Nat Immunol**. 2001. Sep. 2(9):762-4.

STRINGER, J.L., MARKS, L.M., WHITE A. C. JR, ROBINSON, P. Epileptogenic activity of granulomas associated with murine cysticercosis. **Experimental Neurology**. 2003, 183:532-536.

TAKAYANAGUI OM, LEITE JP. Neurocysticercosis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2001 May-Jun, 34(3):283-90

TERRAZAS LI, BOJALIL R, GOVEZENSKY T, AND LARRALDE C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type

response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). **J Parasitol.** 1998, 84, pp. 74-81

TOENJES, S. A., SPOLSKI, R.J., MOONEY, A. AND KUHN, R.E. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. **Parasitology.** 1999, 118(6), pp. 623-33.

UTTARA B1, SINGH AV, ZAMBONI P, MAHAJAN RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol.** 2009 Mar;7(1):65-74

VAZ, A. J. C. M. NUNES, R. M. PIAZZA, J. A. LIVRAMENTO, M. V. DA SILVA, P. M. NAKAMURA E A. W. FERREIRA. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am J Trop Med Hyg.** 1997, 57 (3), pp.354-357.

VERASTEGUI, R.M.; MEJIA, A; CLARK, T.; GAVIDIA, C.M.; MAMANI, J.; CCOPA, F.; ANGULO, N.; CHILI, N.; CARMEN, R.; MEDINA, R.; GARCIA, H.H.; RODRIGUEZ, S.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H. **Am J Pathol.** 2015, 185: 2259e2268;

VINAUD, M.C., LINO JUNIOR R.S. AND BEZERRA J.C.B, *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci, **Experimental Parasitology.** 2007, 116, n.4, pp.335-

WHITE, A. C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. YATSIV, I; MORGANTI-KOSSMANN, MC; PEREZ D; DINARELLO,CA; NOVICK, D; RUBINSTEIN, M; OTTO, VI; RANCAN, M; KOSSMANN, T; REDAELLI, CA; TRENTZ, O; SHOHAMI, E; STAHEL, PF. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2002 Aug, 22(8):971-8.

DISCUSSÃO

Neurocisticercose é a infecção parasitária mais comum e grave do SNC humano (COULDWELL & APUZZO 1992; FLISSER, 1991; SCHENONE *et al.*, 1982). A prevalência está relacionada a fatores socioeconômico-culturais, pela deficiência de condições sanitárias, representando importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento (AGAPEJEV, 2003; DORNY *et al.*, 1991, FLISSER *et al.*, 2003). Importante ressaltar que a incidência da NCC está aumentando em países desenvolvidos por causa da imigração de pessoas de áreas endêmicas e devido ao baixo nível socioeconômico dos imigrantes (FLISSER *et al.* 2003, DEL BRUTTO e GARCIA, 2012; DEL BRUTTO 2014).

Os modelos experimentais têm se tornado uma ferramenta útil para estudar vários aspectos como, fisiopatologia, bioquímica, imunopatologia e tantas outras pesquisas auxiliando nas implementações de novas estratégias fundamentadas contribuindo no entendimento de vários parâmetros. Atualmente existem quatro tipos diferentes de modelo experimentais para NCC. O primeiro foi desenvolvido nos EUA, onde utilizaram *Mesocostoides corti* (CARDONA *et al.* 1999). O segundo desenvolvido por pesquisadores no Brasil utilizando cisticercos de *T. crassiceps* (MATOS-SILVA *et al.*, 2012). Esses dois primeiros grupos utilizaram camundongos como modelo experimental. Recentemente desenvolveram mais dois modelos, um no Perú, onde utilizaram ratos (VERASTEGUI *et al.*, 2015) e outro no México com suínos jovens (FLEURY *et al.*, 2015), esses dois grupos utilizaram cistos (oncosferas ativas) de *T. solium*.

Neste modelo experimental de NCC intraventricular, padronizou-se a parte posterior da calota craniana para inoculações dos cisticercos provocando a implantação desses dentro dos ventrículos. Embora a localização intraventricular seja menos frequente em relação a parenquimal, as manifestações clínicas da cisticercose extra-parenquimatosa são mais agressivas apresentando prevalência em torno de 15 a 54% dos pacientes sintomáticos (APUZZO *et al.*, 1984; ZEE *et al.*, 1993, 2013 KHADE *et al.*, 2013). O parasito ao alcançar a corrente sanguínea, chega aos ventrículos por meio do plexo coróide, provocando oclusão do fluxo de fluido cerebroespinal, de modo contínuo ou intermitente levando a hidrocefalia obstrutiva (APUZZO *et al.* 1984, KHADE *et al.* 2013). A hidrocefalia pode ocasionar morte

súbita pela compressão da irrigação sanguínea e pelo efeito de massa. Em alguns casos a hidrocefalia associa-se aependimite, aracnoidite basal e edema periventricular (KELESIDIS e TSIODRAS 2012; GARCIA *et al.*, 2014a). Aependimite e a hidrocefalia são complicações da NCC nos quais requerem o implante de shunt elevando as taxas de mortalidade do paciente (COLLI *et al* 1986; CUETTER & ANDREWS, 2002; GARCIA *et al* 2014a).

Inicialmente observou-se o influxo de células inflamatórias nos dois grupos analisados, sem diferenças significativas. Embora o procedimento cirúrgico pode ter sido a provável causa da presença dessas células pela ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), queremos destacar que nos animais infectados além das células inflamatórias observou-se o aumento da citocina IL-10. As moléculas e células envolvidas em ativar a resposta imune contra os helmintos permanecem enigmáticas. As infecções contra estes parasitos podem inibir os efeitos das reações inflamatórias excessivas em populações expostas a alguns agentes infecciosos, interferindo na ruptura e no controle imunológico gerando alergia e auto-imunidade (JACKSON 2008, LOUKAS & PROCIV 2001). Antígenos de helmintos geralmente não são bons na indução eficiente de células e esta falha de sinais convencionais para uma boa ativação pode ser devido à falta de expressão dos ligantes dos receptores semelhantes a TOLL (TLR), que podem induzir citocinas antiinflamatória como IL-10, conhecida por diminuir a resposta imune como também a lesão tecidual devido uma resposta uma Th1 eficiente. (KANE *et al.* 2004, RIGANO *et al.* 2007). Além disso o SNC é um microambiente imunologicamente especializado que influencia a resposta imune local, embora a migração de linfócitos para o SNC ocorre em condições fisiológicas e na neuroinflamação (UCCELLI *et al*, 2005). Por se tratar de um “órgão imune privilegiado” as respostas imunes são minimizadas para reduzir as lesões teciduais que em sua maioria são permanentes.

A progressão da doença (30DAI) provocou aumento do processo inflamatório constituído de PMN e MN, presença de macrófagos espumosos e perfil misto das citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-gama no grupo infectado em relação ao controle. A resposta imune pode ser regulada pela baixa expressão de moléculas MHC-II, liberação de citocinas pro inflamatórias (BANGERT *et al.*, 2011). A diferenciação de célula Th em produtoras de IL-4 é um importante passo no desenvolvimento de uma resposta protetora efetiva no hospedeiro para a eliminação dos parasitos. A IL-4 é responsável pela expulsão do parasito intestinal e também é implicado na

amplificação das células Th2, produtoras de IL4, IL-5 e IL-9 e IL-13. Estas citocinas estão envolvidos na ativação de células como mastócitos, eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (M2) e com o aumento da produção de IgE. A resposta Th1, também observada neste período experimental pela produção de IFN-gama, ativação de macrófagos classicamente ativados (M1) com produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, estes capazes de destruir o tegumento do parasito como também o tecido do hospedeiro (FINKELMAN *et al.* 1997). A IL-17 citocina pro inflamatória e quimiotática para neutrófilo, contribui na formação da inflamação e lesão tecidual (LANGRISH *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005) e sua produção excessiva, acarreta danos teciduais e doenças auto-imunes.

Nas lesões teciduais observou-se ventriculomegalia em 80% dos animais analisados, como também alterações nos padrões normais de mielina, que podem associar-se com a presença de células inflamatórias, principais responsáveis pelo desenvolvendo de várias doenças inflamatórias no SNC (BROOKS *et al.*, 2005; OTTO *et al.*, 2002; YATSIV *et al.*, 2002). A desmielinização foi observada em 100% dos casos analisados mostrando-se de forma periventricular e somente 40% foram parenquimal focal. De acordo com a literatura, os mecanismos inflamatórios e o estresse oxidativo gerado na inflamação podem ser causa ou um fator auxiliar na patogenia das principais doenças neurodegenerativas (UTTARA, SINGH *et.al.*, 2009; FERRETTI E BACCHETTI, 2011; OLIVEIRA, KALLAUR *et al.*, 2012) além disso, a ativação de migróglia podem resultar em desmielinização e perda axonal (PETERSON *et al.* 2007).

Nos estágios tardios da infecção (90DAI), a resposta imune sistêmica foi do tipo Th2. A modificação da resposta imune para um perfil regulador do tipo Th2 no final da infecção pode ser devido à mudança de seus antígenos de superfície dificultando o reconhecimento pelo sistema imune (WHITE *et al* 1997; MAIZELS *et al.* 1993). Citocinas imunorreguladoras neste período, como a IL-4 e IL-10, ativam linfócitos T regulatórios e macrófagos alternativamente ativados (AAMØ ou M2) (GORDON, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2010) reduzindo a lesão tecidual. Embora o citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-9 induzem produção de imunoglobulinas importantes na defesa do hospedeiro contra helmintos intestinais, mas se estes se localizam fora do intestino essa resposta favorece a proliferação do parasito (ALONSO-TRUJILLO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2002 Ainda assim as lesões teciduais como ventriculomegalia, ependimite foram observadas de forma

mais acentuada provavelmente pela presença da inflamação constituída principalmente de MN e macrófagos espumosos. De acordo com a literatura, os corpúsculos lipídicos no interior de macrófagos espumosos estão relacionados às diversas condições inflamatórias, e podem funcionar como sítios de armazenamento e síntese de mediadores inflamatórios (eicosanóides) (MELO *et al.*, 2011; MELO & DVORAK, 2012).

Na fase tardia também se observou mudanças nos padrões de mielina que inicialmente eram periventriculares evoluindo para parenquimal focal. Acredita-se que essa alteração pode ter sido provocada pelo efeito de massa ou compressão de estruturas adjacentes. Embora a desmielinização parenquimal é aparentemente mais grave em relação a periventricular, causa provávelde lesão hipóxico-isquêmica por processo não-inflamatório (LOVE *et al.*, 2006).

Este modelo experimental de NCC intraventricular contribuiu com as investigações que relacionam inflamação, resposta imune e neurodegeneração. Embora tenha observado tanto resposta Th1 quanto Th2 são na maioria das vezes, mutuamente antagônicas e tendem a regular uma a outra, a alteração no balanço das citocinas pode representar parte da patogênese das doenças neurodegenerativas. No entanto, essas alterações podem ser um fenômeno de uma doença inflamatória mais complexa que o efeito causal na cascata patológica (IMITOLA *et al.*, 2005). A desmielinização é tema muito discutido na literatura, mas pouco se sabe sobre esse processo na NCC, portanto, outras pesquisas serão necessárias para auxiliar no desenvolvimento de tratamentos que concentram estratégias de bloqueio do ciclo inflamação/neurodegeneração/desmielinização.

CONCLUSÕES

- No começo da infecção não observou diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Aos 30 DAI observou-se ventriculomegalia, infiltrado inflamatório misto, com presença de macrófagos espumosos. No final da infecção, a ventriculomegalia persistia, o processo inflamatório foi predominantemente de mononucleares, com presença de macrófagos espumosos.
- A resposta imune *in situ* na NCC intraventricular experimental, não apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados ao longo do processo experimental.
- Na resposta imune sistêmica, aos 7 DAI a concentração de IL-10 foi significativamente maior no grupo infectado em relação ao controle. Aos 30 DAI, observou-se aumento de todas as citocinas analisadas também no grupo infectado, e no final da infecção predominou a resposta imune do tipo Th2, pela presença da IL-4.
- A desmielinização só foi observada a partir dos 30 DAI em 100% dos animais analisados de forma periventricular. No final da infecção a 80% apresentaram desmielinização parenquimal de forma focal.

8 RECOMENDAÇÕES (se pertinentes)

REFERÊNCIAS

- ABELLA V, SCOTECCE M, CONDE J, LÓPEZ V, LAZZARO V, PINO J, GÓMEZ-REINO JJ, GUALILLO O. Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases. *J Immunol Res*. 2014, 2014:343746.
- ACHA P., SZIFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **OPS/OMS** 1986, pp.989.
- AGAPEJEV S., POUZA A. F. P, BAZAN R., FALEIROS A.T.S. Aspectos clínicos e evolutivos da hidrocefalia na neurocisticercose. **Arq Neuropsiquiatr**. 2007, 65(3-A), pp. 674-680.
- AGAPEJEV, S. Aspectos Clínico-Epidemiológicos da Neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. 2003, 61(3B), pp. 822-828.
- ALBUQUERQUE ES, GALHARDO I. Neurocysticercosis in the State of Rio Grande do Norte: report of 8 cases. **Arq Neuropsiquiatr**. 1995, 53:464-470.
- ALOISI F, RIA F, ADORINI L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. **Immunol. Today**. 2001, 21:141–147. [PubMed: 10689302].
- ALONSO-TRUJILLO, J., RIVERA-MONTOYA I., RODRIGUEZ-SOSA, M. AND TERRAZAS L. I. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Parasitol**. 2007, Res, 100(6), pp. 1341-50.
- ALVAREZ, J. I. AND TEALE, J. M. Breakdown of the blood brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. **Journal of Neuroimmunology**. 2006, 173, pp. 45–55.
- ALVAREZ, J. I. AND TEALE, J. M. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. **Journal of Neuroimmunology**, 2007a, 187, pp. 102–113.
- ALVAREZ, J. I. AND TEALE, J. M. Evidence for differential changes of junctional complex proteins in murine neurocysticercosis dependent upon CNS vasculature. **Brain Research**. 2007b, 169, pp. 98–111.
- ALVAREZ, J.I., MISHRA, B.B., GUNDRU U.M., MISHRA, P.K., TEALE, J.M. Mesocercoides corti intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. **Parasitology**. 2010, 137, pp. 359-372.
- ALVAREZ, J.L., RIVERA, J., TEALE, J.M. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. **Plos neglected tropical diseases**. 2008, 2, pp. 1-12.
- APUZZO ML, DOBKIN WR, ZEE CS, CHAN JC, GIANNOTTA SL, WEISS MH. Considerações cirúrgicas no tratamento da cisticercose intraventricular. Uma análise de 45 casos. **J Neurosurg**. 1984 Feb, 60 (2): 400-7.
- ARECHAVALETA F, MOLINARI JL, AND TATO P 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. **Parasitol Res**. 1998, 84, pp. 117-122.
- AROCKER-METTINGER, E., V., HUBER-SPITZY, H., AUER, G., GRABNER AND M. STUR, M. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye. A case report. **Klin Monatsbl Augenheilkd**. 1992, 201(1), pp. 34-37.

BALABANOV R, BEAUMONT T, DORE-P. DUFFY. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. **J Neurosci Res.** 1999, 55 (5): 578-87.

BANGERT, C.; BRUNNER, P.M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology.** 2011, v. 29, pp. 60–376.

BANKS WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. **Forum Nutr.** 2010; 63:102-10. Review.

BEZZI P, VOLTERRA A. A neuron-glia signalling network in the active brain. **Curr. Opin. Neurobiol.** 2001, 11:387–394. [PubMed: 11399439]

BROOKS, T.A.; HAWKINS, B.T.; HUBER, R.D.; EGLETON, R.D. AND DAVIS, D.T.P. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.** 2005, pp. 289:H743.

BROWN SW, MEYERS RT, BRENNAN KM, RUMBLE JM, NARASIMHACHARI N, PEROZZI EF, et al. Catecholamines in a macrophage cell line. **J Neuroimmunol.** 2003, 135, pp. 47–55.

CACQUEVEL M 1, LEBEURRIER N, CHÉENNE S, VIVIEN D. As citocinas em neuroinflamação e doença de Alzheimer. **Alvos Curr de medicamentos.** 2004 agosto, 5 (6): 529-34.

CAMPANELLA, M.M.S., SCIORATI, C., TAROZZO, G., BELTRAMO, M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. **American Heart Association.** 2002, Inc. 33, pp. 586-592.

CARDONA, A.E., GONZALEZ, P.A., TEALE, J.M. CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma-delta T cells in amplification of the host immune response. **Infection and immunity.** 2003, 7, pp. 2634-2642

CARDONA, A.E.; RESTREPO, B.I.; JARAMILLO, J.M.; TEALE, J.M. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. **J. Immunol.** 1999, 162, pp. 995-1002.

CARDONA, A.E.; TEALE, J.M. Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. **J. Immunol.** 2002, 169, pp. 3163-3171.

CARPIO, A., ESCOBAR A. & HAUSER, W. A. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. **Epilepsia.** 1998, 39(10), pp. 1025-40.

CARSON JH, GAO Y, TATAVATY V, LEVIN MK, KORZA G, FRANCONI VP, KOSTURKO LD, MAGGI NTO MJ, BARBARESEE. Multiplexed RNA trafficking in oligodendrocytes and neurons. **Biochim Biophys Acta.** 2008 Aug, 1779(8):453-8. doi: 10.1016/j.bbarm.2008.04.002. Epub 2008 Apr 10.

CARLSON, S.L.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J .E.; DOTY, K.; DOSSETT, L. Acute Inflammatory Respon Spinal Cord Following Impact Injury. **Experimental Neurology.** 1998, 151:77-88.

CAVELLANI, C. L., FALEIROS, A. C. G., LINO-JUNIOR, R. S., REIS M. A. AND TEIXEIRA, V. P. A. Cysticercosis in the elderly. **Annals of Diagnostic Pathology.** 2007, 11, pp. 330-333.

CHAVARRÍA, A., FLEURY, A., GARCIA, E., MARQUEZ, C., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E. (2005) Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. **Clinical Immunology.** 2005, 116(3), 271–278. doi:10.1016/j.clim.2005.04.008.

CHOI D. antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? **Mt Sinai J med.** 1998, 65(2):133-8.

CHOI MY, CHO SH. Optic neuritis after bee sting. **Korean J Ophthalmol.** 2000, 14(1):49-52.

COLLI, B. O., MARTELLI, N., ASSIRATI, J. A. JR., MACHADO, H. R., DE VERGUEIRO, F. S. Results of surgical treatment of neurocysticercosis in 69 cases. **Journal of Neurosurgery.** 1986, 65(3), 309–315.

CONSTAM DB, PHILIPP J, MALIPIERO UV, TEN DP, SCHACHNER M, FONTANA A. Differential expression of transforming growth factor- β 1, - β 2, and - β 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. **J. Immunol.** 1992, 148:1404–1410. [PubMed: 1538124]

CONTI p. KEMPURAJ D, KANDERE K, DIGIOACCHINO M, BARBACANE RC, CASTELLANI ML, FELACO M, BOUCHER W, LETOURNEAU R, THEOHARIDES TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not Always. **Immunol Lett.** 2003, 3;86(2):123-9.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS, S. L. Pathologic basis of disease. **Philadelphia: W.B. Saunders Company.** 1999, 6 ed. 1425 pp.

COULDWELL, W.T., APUZZO, M.L.J. Cysticercosis cerebri. **Neurosurg Clin North Am,** 1992, v.3, n.2, pp. 471-481.

CUETTER, A. C., ANDREWS, R. J. Intraventricular neurocysticercosis: 18 consecutive patients and review of the literature. **Neurosurgical Focus.** 2002, 12(6 e 5).

DAVIS BK. Evaluation of classical, alternative, and regulatory functions of bone marrow-derived macrophages. **Methods Mol Biol.** 2013, 1032: 79-89. doi: 10.1007 / 978-1-62703-496-8_6.

DE ALUJA, A. & VARGAS, G. The histopathology of porcine cysticercosis. **Vet Parasitol.** 1988, 28(2), pp. 65-77.

DE ALUJA, A. S., MARTINEZ, M. J., AND VILLALOBOS, A. N. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. **Vet Parasitol.** 1998; 76(12), pp. 71-79.

DEL BRUTTO O.H. Neurocysticercosis: A Review. **The Scientific World Journal.** 2012, pp. 1-8.

DEL BRUTTO O.H., AND SOTELO J. Neurocysticercosis: an update. **Rev Infect Dis.** 1988, 10, pp. 1075-1087.

DEL BRUTTO OH. Neurocysticercosis. **The Neurohospitalist.** 2014. 4(4), pp. 205-212. doi: 10.1177/1941874414533351.

DEL BRUTTO, O. H., GARCÍA, H. H. Neurocysticercosis in Nonendemic Countries: Time for a Reappraisal. **Neuroepidemiology.** 2012, 39(2), 145–146. doi:10.1159/000341693.

EVANS, C. A., GARCIA, H. H., HARTNELL, A., GILMAN, R. H., JOSE, P. J., MARTINEZ, M., REMICK, D.G., WILLIAMS, T. J., FRIEDLAND, J. S. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. **Infection and Immunity.** 1998, 66(9), 4522–4525.

FERRETTI G1, BACCHETTI T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. **JNeurol Sci.** 2011, 15, 311(1-2):92-7.

FINKELMAN FD, SHEA-DONOHUE T, GOLHILL, J, SULLIVAM CA, MORRIS SC, MADDEN KB< GAUSEWC, URBAN JF JR. Regulation of cytokine defense of the host against parasitic gastrointestinal nematodes: studies lessons with rodent models. **Annu Rev Immunol.** 1997, 15:505-33.

FLEURY A., TREJO A., CISNEROS, H., GARCÍA-NAVARRETE, R., VILLALOBOS, N., HERNÁNDEZ, M., HERNÁNDEZ, J.V., HERNÁNDEZ, B., ROSAS, G., BOBES, R.J., ALUJA, A.S., SCIUTTO, E., FRAGOSO, G. *Taenia solium*: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2015, 10.1371.

FLISSER A *et al.* Cysticercosis Present State of knowledge and Perspectives, New York: **Academic Press**. 1982.

FLISSER A, PLANORTE A, COREA D, RODRIGUEZ-DEL-ROSAL E, FELDMAN M, SANDOVAL M, TORRES A, MEZA A, PARKHOUSE RM, HARRISON LJ, *et al.* New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. **Ann Parasitol Hum Comp**. 1999, 65 suppl 1:95-9

FLISSER, A. Taeniasis-cysticercosis: an introduction. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 1991; 22, 233-235.

FLISSER, A., SARTI, E., LIGHTOWLERS, M., SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica**. 2003; 87(1), 43-51. doi:10.1016/S0001-706X(03)00054-8.

FLÜGEL A, SCHWAIGER FW, NEUMANN H, MEDANA I, WILLEM M, WEKERLE H, KREUTZBERG GW, GRAEBER MB. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. **Brain Pathol**. 2000, 10:353–364. [PubMed: 10885654].

FOX RJ, FISHER E, RUDICK R. Disease modifying therapies for multiple sclerosis. **Neurology**. 2002, 59 (3): 471-2.

FRAGOSO, G.; LAMOYI, E.; MELLOR, A.; LOMELI, C.; HERNANDEZ, M.; SCIUTTO, E. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa2 Transgenic Mice. **Infection and Immunity**. 1998, 66(2):760764.

FRANÇOIS AMD, FAVENNEC LPD, CAMBON-MICHOT CMD, GUEIT IMD, BIGA NORMAN MD, TRON FMD, PH.D BPMD, PH.D HEMET JMD. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? **Am J Surg. Pathol**. 1998, 22:488-492.

FRANKLIN RJ. Because fail demyelination in multiple sclerosis? **Nat Rev Neurosci**. 2002, 3 (9): 705-14.

FREEMAN, R. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). **Canadian Journal of Zoology**. 1962, 40, pp. 969-990.

GARCIA, H. H., NASH, T. E., DEL BRUTTO, O. H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. **The Lancet Neurology**. 2014a, 13(12), 1202-1215. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70094-8.

GASPARETTO, E.L.; EIRAS DE ARAÚJO, A.L.; RODRIGUES, R.S.; MARCHIORI, E.; PINHEIRO, R.A.; FLORES, M.; ALVES, J.R.D. Migrating intraventricular cysticercosis. **Arq Neuropsiquiatr**. 2008, 66(1), pp. 111-113.

GAUSE WC, URBAN JF JR, STADECKER MJ. The immune response to helminth parasites: insights from mouse models. **Trends Immunol**. 2003, 24 (5): 269-77.

GEMMELL MA, AND JOHNSTONE PD. Efficacy of praziquantel against ovine cysticercosis caused by *Taenia hydatigena*. **Res Vet Sci**. 1983, 34: 199-204.

GEMMELL, MA. LAWSON, JR. The ovine cysticercosis as models for research into the epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium*: I. Epidemiological considerations. **Acta Leiden**. 1989, 57(2):165-72

GINSBERG MD, HEDLEY-WHYTE ET, RICHARDSON EP JR. Hypoxic-ischemic leukoencephalopathy in man. **Arch Neurol**. 1976, 33:5–14.

GOLD R, SCHMIED M, TONTSCH U, HARTUNG H-P, WEKERLE H, TOYKA KV, LASSMANN H. Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes

for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis *in vivo*. **Brain**. 1996, 119 (Pt 2):651–659. [PubMed: 8800954].

GOMES-LEAL, W. Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal. 2002. 197f. Tese (Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immuno**. 2003, 3, pp. 23-35.

GRAÇA DL, BLAKEMOR E W F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 1986, 12: 593, 1986.

GRAY H, CHURCHILL LIVINGSTONE. Gray's anatomy. **Harcourt Brace: London**. 1995.

HAWKINS BT, DAVIS TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol Rev**. 2005, 57(2): 173-85.

HAYDON PG. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat. Rev. Neurosci**. 2001; 2:185–193. [PubMed:11256079].

HELDWEIN K, BIEDERMANN HG, HAMPERL WD, BRETZEL G, LOSCHER T, LAREGINA D, FROSCH M, BUTTNER DW, AND TAPPE D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. **Am J Trop Med Hyg**. 2006, 75: 108-111.

HICKEY WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. **Brain Pathol**. 1991, 1(2):97-195.

HUCKEY WF, KIMURA H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. **Science**. 1988, 15;239(4837): 290-2.

JACKSON F. Nutrition and immunity of nematodes of livestock. **Parasite Immunol**. 2008, 30: 61-62.

JANCIAUSKIENE, S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2001, 1535: 221-235.

KANE CM, CERVI L, SUN J, MCKEE AS, MASEK KS, SHAPIRA S, HUNTER CA, AND PEARCE EJ. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. **J Immunol**. 2004, 173: 7454-7461.

KANNER AM. Depression in epilepsy: a neurobiologic perspective. **Epilepsy Curr**. 2005, 5(1), pp. 21- 27.

KELESIDIS, T., TSIODRAS, S. Extraparenchymal neurocysticercosis in the United States. **The American Journal of the Medical Sciences**. 2012, 344(1), 79–82. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823e6565.

KHADE P, LEMOS RS, TOUSSAINT LG. What is the use of anthelmintic postoperative resection therapy for intraventricular neurocysticercosis? **World Neurosurg**. 2013, 79(3-4):558-67.

KHADE P, LEMOS RS, TOUSSAINT LG. What is the utility of postoperative antihelminthic therapy after resection for intraventricular neurocysticercosis? **World Neurosurg**. 2013, 79(3-4):558-67. doi: 10.1016/j.wneu.2011.05.053. Epub 2011 Nov 7.

KIPP M, VAN DER VALK P, AMOR S. Pathology of multiple sclerosis. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. 2012, 11(5):506-17.

KREUTZBERG GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**. 1996, 19:312–318. [PubMed: 8843599].

LACLETTE JP, MERCHANT MT, DAMIAN RT, AND WILLMS K. Crystals of virus-like particles in the metacestodes of *Taenia solium* and *T. crassiceps*. **J Invertebr Pathol.** 1990,56, pp.215-221.

LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A., CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine.** 2005,201(2), 233–240. doi: 10.1084/jem.20041257.

LARRALDE, C. MORALES, J., TERRAZAS, I., GOVEZENSKY, T., ROMANO, M.C. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. **J Steroid Biochem Molec Biol.** 1995, 52:575580.

LASSMANN, H. Multiple sclerosis: is there neurodegeneration independent from inflammation? **J Neurol Sci.** 2007, 15; 259(1-2):3-6.

LAZZARINI L, CONTI E, DITRI L, TURI G, DE LALLA F. Clostridial orthopedic infections: case reports and review of the literature. **J Chemother.** 2004,16(1):94-7.

LEAKE JA, BILLMAN GF, NESPECA MP, *et al.* Pediatric acute hemorrhagic leukoencephalitis: report of a surviving patient and review. **Clin Infect Dis.** 2002, 34:699–703.

LEID RW, MC CONNEL LA. PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode, *Taenia taeniformis*. **Prostaglandins Leukot Med.** 1983, 11: 317-323.

LING EA, WONG WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. **Glia.** 1993, 7:9–18. [PubMed: 8423067].

LINO JR, RUY DE SOUZA; FALEIROS, ANA CAROLINA G.; REIS, MARLENE ANTÔNIA; TEIXEIRA, VICENTE DE PAULA A. Anatomia Patológica da Cisticercose. [online] [citado 06 Janeiro 2006]. Disponível na World Wide Web:

LINO-JR, R. S., RIBEIRO, P. M., ANTONELLI, E. J., FALEIROS, A. C., TERRA, S. A., REIS, M. A., TEIXEIRA, V. P. A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 2002, 35, 617-622.

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev.** 1999, 79(4):1432-568.

LOCKSLEY RM. Th2 cells: help for helminths. **J Exp Med.** 1993, 179. pp.1405-1407.

LOPEZ-BRIONES S, SCIUTTO E, VENTURA JL, ZENTELLA A, AND FRAGOSO G 2003. CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. **Parasitol Res.** 2003, 90, pp.157-163.

LOUKAS A, AND PROCIV P. Immune responses in hookworm infections. **Clin.Microbiol.** 2001, Rev 14: 689-703, table of contents.

LOVE S. Demyelinating diseases. **J Clin Pathol.** 2006, 59(11):1151-9.

LUCCHINETTI C, BRUCK W, PARISI J, *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol.** 2000, 47:707–17.

MACHADO, ALUÍZIO DE BARROS BARRETO, PIALARISSI, CARMEN SILVIA DE MELO E VAZ, ADELAIDE JOSÉ. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública.** 1988, [online]. jun. 1988, vol.22, no.3 [citado 15 Janeiro 2006], p.240-244. Disponível na World Wide Web: www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101988000300012&lng=pt&nrm=iso. ISSN 0034-8910.

MAILLARD, H.; MARIONNEAU, J.; PROPHETTE, B.; BOYER, E.; CÉLERIER, P. *Taeniocrassiceps* cysticercosis and AIDS. **AIDS**. 1998, v.12, p. 1551-1566.

MAIZELS RM, AND YAZDANBAKHS M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol**. 2003, 3: 733-744.

MARQUÉZ-MONTER H. Patología de la cisticercosis. **Gaceta Medica de Mexico**. 1972, 103, 230-242.

MARTIN JJ, CRAS P. Familial erythrophagocytic lymphohistiocytosis. A neuropathologic study. **Acta Neuropathol**. 1985, 66(2):140-4.

MATOS-SILVA, H.; RECIPUTTI, B.P.; PAULA, E.C.; OLIVEIRA, A.L.; MOURA, V.B.L.; VINAUD, M.C.; OLIVEIRA, M.A.P.; LINO-JÚNIOR, R.S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. Current imaging techniques. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**. 2011, v.59, n.5, pp. 540–56.

MATSUMOTO Y, HANAWA H, TSUCHIDA M, ABO T. *In situ* inactivation of infiltrating T cells in the central nervous system with autoimmune encephalomyelitis. The role of astrocytes. **Immunology**. 1993, 79:381–390. [PubMed: 7691723].

MC DOONALD, WI, COMPSTON, A, EDAN, G, *et al*. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Ann Neurol**. 200,; 50:121.

MEDINA-ESCUTIA, E., MORALES-LÓPEZ, Z., PROAÑO, J. V., VÁZQUEZ, J. BERMÚDEZ, V. ORTIZ-NAVARRETE, V., MADRID-MARINA, V., LACLETTE, J. P., CORREA, D. Cellular Immune Response and Th1/Th2 Cytokines in Human Neurocysticercosis: Lack of Immune Suppression. **Journal of Parasitology**. 2001, 87 (3): 587-590. 2001 doi: [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0587:CIRATT\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0587:CIRATT]2.0.CO;2)

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**. 2011, v.59, n.5, pp. 540–56.

MELO, R.C.N.; DVORAK, A.M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? **PLoS Pathogens**. 2012, v. 8, n. 7, pp.1-13.

MENDES, ERNANI C.; SILVA, SCINTILLA S.; FONSECA, E. A. LA TERZA; SOUZA, HILIANA R. R.; CARVALHO, RAIMUNDO W. A Neurocisticercose Humana na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Arquivo Neuropsiquiatria**, 2005, 63(4): p.1058-1062. ISSN 0004-282X.

MERGENTHALER, P, DIRNAGL, U, MEISEL. A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease, Morgantown**. 2004, 19(3/4).

MISHRA BB, MISHRA PK, TEALE JM. Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. **J Neuroimmunol**. 2006, 181:46–56.

MMWR. Morbidity and Mortality. **Weekly Report**. 1992, 41(37), 691-699.

MOONEY KA, SPOLSKI RJ, SEE EJ, AND KUHN RE. Immune destruction of larval taenia crassiceps in mice. **Infect Immun**. 2000, 68, 2393-2401.

NEUMANN H, SCHMIDT H, WILHARM E, BEHRENS L, WEKERLE H. Interferon γ gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. **J. Exp. Med**. 1997, 186:2023–2031. [PubMed:9396771].

OFFEN D, ZIV I; GORODIN S, BARZILAI A.; MALIK Z, MELAMED E. Dopamine-induced programmed cell death in mouse thymocytes. **Biochim Biophys Acta**. 1995, 31:1, pp.71–7.

OKSENBERG, J.R., BARANZINI, S.E., BARCELLOS, L.F., HAUSER, S. L. Multiple sclerosis: genomic rewards. **J. Neuroimmunol**. 2001, 113: 171–184.

OLIVEIRA SR, KALLAUR AP, SIMÃO AN, MORIMOTO HK, LOPES J, PANIS C, PETENUCCI DL, DA SILVA E, CECCHINI R, KAIMEN-MACIEL DR, REICHE EM. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. **J Neurol Sci**. 2012, 321 (1-2): 49-53. doi: 10.1016 / j.jns.2012.07.045. Epub 2012 09 de agosto.

OLIVEIRA, M. A. P., SANTIAGO, H. C., LISBOA, C. R., CERAVOLLO, I. P., TRINCHIERI, G., GAZINELLI, R. T., VIEIRA, L. Q.(2000). *Leishmania* sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL12 and IFN-g synthesis. **Experimental Parasitology**. 2000, 95(2), 96-105. doi:10.1006/expr.2000.4523.

OLSSON T, KRISTENSSON K, LJUNGDAHL A, MAEHLEN J, HOLMDAHL R, KLARESKOG L. γ -interferon-like immunoreactivity in axotomized rat motor neurons. **J. Neurosci**. 1989, 9:3870–3875. [PubMed:2511280.]

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis en America Latina. Washington: OPS/OMS, 297p.1994.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL PANAMERICANA DE LA SALUD. Zoonosis parasitarias: informe de um Comitê de Expertos de la OMS, con la participación de la FAO. Ginebra OPS, 1979, 135p.

OSTROSKY-ZEICHNER L, GARCÍA-MENDOZA E, RÍOS C, SOTELO J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. **Arch Med Res**. 1996, 27 (4): 513-7.

OTTO VI, GLOOR SM, FRENTZEL S, GILLI U, AMMANN E, HEIN AE, FOLKERS G, TRENTZ O, KOSSMANN T, MORGANTI-KOSSMANN MC. The production of macrophage inflammatory protein-2 induced by soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes is mediated by src tyrosine kinases and p42/44 mitogen-activated protein kinase. **J Neurochem**. 2002, 80(5):824-34.

OUCHI Y, KANNO T, OKADA H, YOSHIKAWA E, FUTATSUBASHIM, NOBEZAWA S, TORIZUKA T, TANAKA K. Changes in dopamine availability in the nigrostriatal and mesocortical dopaminergic systems by gait in Parkinson's disease. **Cérebro**. 2001, 124 (Pt 4):784-92.

PADILLA A, GOVEZENSKY T, SCIUTTO E, JIMENEZ-GARCIA LF, GONSEBATT ME, RAMIREZ P, AND LARRALDE C. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. **J Parasitol**. 2001, 87, pp. 591-599.

PAL, D. K., A. CARPIO, *et al*. "Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries." **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2000;68(2), 2000. pp. 137-43.

PAPADOPOULOS H., HIMONAS C., PAPAZHARIADOU M., ANTONADOUSOTIRIADOU K. Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. **Journal of Helminthology**. 1997, 71, pp. 227–231.

PARK K, BAVRY AA. Risk of stroke associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Vasc Health Risk Manag**. 2014, 10:25-32.doi: 10.2147/VHRM.S54159. Epub 2014 Jan 6. Review.

PARK, H., LI, Z., YANG, X. O., CHANG, S. H., NURIEVA, R., WANG, Y. H., WANG, Y., HOOD, L., ZHU, Z., TIAN, Q., DONG, C. A distinct lineage of CD4 T

cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**. 2005, 6(11), 1133–1141. doi:10.1038/ni1261.

PAWLOWSKI Z, SCHULTZ MG. Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). **Adv Parasitol**. 1972, 10: 269-343.

PERRY E. Cholinergic signaling in Alzheimer disease: therapeutic strategies. *Alzheimer*. **Dis Assoc Disord**. 1995, 9 Suppl 2: 1-2.

PETERSON, L.K. FUJINAMI, R.S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. 2007, v.184, n.1-2, Mar, p37-44.

PIEHL F, LIDMAN O. Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immunereactions. **Immunol Rev**. 2001, 184:212–225. [PubMed: 2086314]

PITELLA, J.E.H. Neurocysticercosis. **Brain Pathology**. 1997, v. 7, pp. 681-693.

POPOVICH, P.G.; GUAN, Z.; WEI, P.;HUITLNGA, I.; VAN ROOIJEN, N.; STOKES, B. T. Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. **Experimental Neurolog**. 1999, 158:351-365.

POPOVICH, P.G.; HICKEY, W.F. Bone Marrow Chimeric Rats Reveal The Unique Distribution of Resident Recruited Macrophages in the Contused Rat Spinal Cord. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. 2001, 60:676-685. 11.

POPOVICH, P.G; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W.F.; BASSO, D.M. The Neuropathological and Behavioral Consequences of Intraspinal Microglia1/Macrophage Activation. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. 2002, 61:623-633.

PURVES SJ, PURVES GB. An American-Canadian neurologist returns to Canada. . **Can J Neurol Sci**. 2005, 32(2):264-5; author reply 266.

QIN X, QIU C, ZHAO L. Lysophosphatidyl choline perpetuates macrophage polarization toward classically activated phenotype in inflammation. **Cell Immunol**. 2014, 289(1-2):185-90. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.04.010. Epub 2014 May 2.

RESTREPO BI, ALVAREZ JI, CASTANO JA, ARIAS LF, RESTREPO M, TRUJILLO J, COLEGIAL CH, TEALE JM: Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. **Infect Immun**. 2001, 69:4554-4560.

RESTREPO, B. I., AGUILAR, M. I., MELBY, P. C. AND TEALE, J. M. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2001a, 65, pp. 366–370.

RESTREPO, B. I., ALVAREZ, J. I., CASTANO, J. A., ARIAS, L. F., RESTREPO, M., TRUJILLO, J., COLEGIAL, C. H. AND TEALE, J. M. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. **Infection and Immunity**. 2001b, 69, pp. 4554–4560.

REY L.. Parasitologia- Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. **Guanabara Koogan**, 2008, 4º ed.

REY, L. Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1991, 2 ed. 731p.

REY, L. As bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1992, 349p. [[Links](#)]

REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1973, 695p. [[Links](#)]

RIGANO R, BUTTARI B, PROFUMO E, ORTONA E, DELUNARDO F, MARGUTTI P, MATTEI V, TEGGI A, SORICE M, AND SIRACUSANO A. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. **Infect Immun.** 2007, 75: 1667-1678.

ROBINSON, P., ATMAR, R. L., LEWIS, D. E. AND WHITE, A. C. Jr. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. **Infect Immun.** 1997, 65(7), pp. 2925-31.

RODRIGUEZ-SOSA M, DAVID JR, BOJALIL R, SATOSKAR AR, AND TERRAZAS LI. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. **J Immunol.** 2002, 168: 3135-3139.

RODRIGUEZ-SOSA, M., SAAVEDRA, R., TENORIO, E.P., ROSAS, L.E., SATOSKAR, A.R., AND TERRAZAS, L.I. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infect Immun.** 2004, 72(8):4552-60.

ROPPA, LUCIANO. Carne Suína: Mitos e Verdades. [online] [citado 06 Janeiro 2006]. Disponível na World Wide Web:

SCHENONE H, VIILAROEL F, ROJAS A RAMIREZ R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: Flisser A *et al.*eds. Cysticercosis Present State of Knowledge and Perspectives. **New York: Academic Press.** 1982, 25-38.

SCHWARTZ, M.; MOALEM, G. Beneficial Immune Activity after Cns Injury: Prospects for Vaccination. **Journal of Neuroimmunology**, 2001, 113:185-192.

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

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E.; PERRY, V.H. Acute Inflammatory Responses to Mechanical Lesions in the Cns: Differences between Brain and Spinal Cord. **European Journal of Neuroscience.** 1999, 11:3648-3658.

SCHWARTZ, M.; MOALEM, G. Beneficial Immune Activity after Cns Injury: Prospects for Vaccination. **Journal of Neuroimmunology.** 2001, 113:185-192

SHIMALOV VV, AND SHIMALOV VT. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. **Parasitol Res.** 2003, 89: 77-78.

SHOOK BA1, LENNINGTON JB, ACABCHUK RL, HALLING M, SUN Y, PETERS J, WU Q, MAHAJAN A, FELLOWS DW, CONOVER JC. Ventriculomegaly associated with ependymal gliosis and declines in barrier integrity in the aging human and mouse brain. **Aging Cell.** 2014, 13(2):340-50.

SIEGEL A, ROELING TA, GREGG TR, KRUK MR. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. **Neurosci Biobehav Rev.** 1999; 23(3):359-89.

SILVA, A.V., MARTINS, H.H., MARQUES, C.M., YACUBIAN, E.M.T., SAKAMOTO, A.C., CARRETE JR, H., CENTENO, R.S., STAVALE, J.N., CAVALHEIRO, E.A. Neurocysticercosis and microscopic hippocampal dysplasia in a patient with refractory mesial temporal lobe epilepsy. **Arquivos de Neuropsiquiatria.** 2006, 64:3, pp. 09-313.

STAMATOVIC SM, KEEP RF, ANDJELKOVIC AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. **Curr Neuropharmacol.** 2008, 6(3):179-92.

STANGEL M, HARTUNG HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. **Prog Neurobiol.** 2002, 68(5):361-76.

STEINMAN, L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. **Nat Immunol.** 2001, 2(9):762-4.

STRINGER, J.L., MARKS, L.M., WHITE A. C. JR, ROBINSON, P. Epileptogenic activity of granulomas associated with murine cysticercosis. **Experimental Neurology**. 2003, 183:532-536.

TAKAYANAGUI O. M., LEITE J. Neurocysticercose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2001, 34(3): 283-290.

TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the Secondary Injury Theory of Acute Spinal Cord Trauma with Emphasis on Vascular Mechanisms. **Journal of Neurosurgery**. 1991, 75:15-26.

TERRAZAS LI, BOJALIL R, GOVEZENSKY T, AND LARRALDE C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). **J Parasito**. 1998, 84, pp. 74-81.

TERRAZAS LI. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. **Curr Top Med Chem**. 2008, 8, pp. 383-392.

TOENJES SA, AND KUHN RE. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. **Parasitol Res**. 2003, 89, pp. 407-413.

TOENJES, S. A., SPOLSKI, R.J., MOONEY, A. AND KUHN, R.E. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. **Parasitology**. 1999, 118(6), pp. 623-33.

TRAJKOVIC V, VUCKOVIC O, STOSIC-GRUJICIC S, MILJKOVIC D, POPADIC D, MARKOVIC M, BUMBASIREVIC V, BACKOVIC A, CVETKOVIC I, HARHAJI L, RAMIC Z, MOSTARICA SM. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. **Glia**. 2004, 47:168-179. [PubMed: 15185395].

UBOGU E.E, COSSOY MB, RANSOHOFF RM. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. **Trends Pharmacol Sci**. 2006, 27 (1): 48-55. Epub 28 de novembro de 2005.

UCCELLI, A., ALOISI, F. *et al*. Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment. **Trends Immunol**. 2005, 26(5): 254-259.

UTTARA B1, SINGH AV, ZAMBONI P, MAHAJAN RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**. 2009, 7(1):65-74.

VAN HORSSSEN J, WITTE ME, CICCARELLI O. The role of mitochondria in axonal degeneration and tissue repair in MS. **Mult Scler**. 2012, 18 (8): 1058-1067. doi: 10.1177 / 1352458512452924. Epub 21 de junho de 2012.

VAN MEETEREN ME, TEUNISSEN CE, DIJKSTRA CD, VAN TOL EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. **Eur J Clin Nutr**. 2005, 59 (12): 1347-1361.

VANIO, S.; IKONEN, E. Macrophage cholesterol transport: A critical player in foam cell formation. **Annals of Medicine, Stockholm**, 2003, v. 35, n. 3, p. 146-155..

VAZ, A. J., NUNES, C. M., PIAZZA, R. M., LIVRAMENTO, J. A., DA SILVA, M. V., NAKAMURA P. M. AND FERREIRA, A. W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am J Trop Med Hyg**. 1997, 57(3), pp.354-357.

VERASTEGUI, R.M.; MEJIA, ^a; CLARK, T.; GAVIDIA, C.M.; MAMANI, J.; CCOPA, F.; ANGULO, N.; CHILI, N.; CARMEN, R.; MEDINA, R.; GARCIA, H.H.; RODRIGUEZ, S.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H. **Am J Pathol**. 2015, 185: 2259e2268.

VILLA P, BIGINI P, T MENNINI, AGNELLO D, LARAGIONE T, CAGNOTTO A, B VIVIANI, MARINOVICH M, CERAMI A, COLEMAN TR, BRINES M, GHEZZI P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. **J Exp Med.** 2003, 198 (6): 971-5.

VILLA, O.F. AND KUHN, R.E Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. **Parasitology.** 1996, 112:561-570.

VINAUD, M. C., LINO JUNIOR, R. S., AND BEZERRA, J. C. **Exp Parasitol.** 2007, 116(4), pp. 335-9.

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

WHO. 2008. http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/ acessado em 10/03/2008.

WHO. A Proposal to Declare Neurocysticercosis in International Reportable Disease. Geneva: WHO, 2000.

WUNSCHMANN A, GARLIE V, AVERBECK G, KURTZ H, AND HOBERG EP. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. **J Vet Diagn Invest.** 2003, 15: 484-488.

WYSS-CORA Y, T.; MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease -a DoubleEdged Sword. **Neuron.** 2002; 35:419-432.

XANTHOS DN, SANDKÜHLER J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nat Rev Neurosci.** 2014, 15 (1): 43-53. doi: 10.1038/nrn3617.

YAO Z, FANSLOW WC, SELDIN MF, ROUSSEAU AM, PAINTER SL, COMEAU MR, COHEN JI, SPRIGGS MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity.** 1995, 3:811-821.

YATSIV, I; MORGANTI-KOSSMANN, MC; PEREZ D; DINARELLO, CA; NOVICK, D; RUBINSTEIN, M; OTTO, VI; RANCAN, M; KOSSMANN, T; REDAELLI, CA; TRENTZ, O; SHOHAMI, E; STAHEL, PF. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2002, 22(8):971-8.

ZEE CS, GO JL, KIM PE, DIGIORGIO CM. Imaging of neurocysticercosis. Neuroimaging. **Clin N Am.** 2000, 10: 391-407.

ZEE CS, SEGALL HD, DESTIAN S, J AHMADI, APUZZO ML. MRI of intraventricular cysticercosis: surgical implications. **J Comput Assist Tomogr.** 1993, 17 (6): 932-9.

ZENTENO-ALANIS, G.H. A classification of human cysticercosis. In: FLISSER, A. et al. (Ed.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. **New York: Academic.** 1982, p.107-126.

ZHAO H, SHIMOHATA T, WANG JQ, SUN G, SCHAAL DW, SAPOLSKY RM. et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. **J Neurosci.** 2005, 25: 9794-9806.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás com protocolo de Nº 010 /11.

Anexo 2 – Comprovantes de submissão dos artigos/ aceite para publicação para artigos ainda não publicados/ dói dos artigos publicados

16-Oct-2015

Dear Dr. Lino Junior

Manuscript ID: PAR-2015-0271.R2

Title: CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN INTRAVENTRICULAR EXPERIMENTAL NEUROCYSTICERCOSIS

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Parasitology and will now be sent to Press. It is now essential that:

1) If applicable, you mail publishers' permissions to use previously published material from other sources to the following address:

Journals Production

Cambridge University Press

Shaftesbury Road Cambridge

CB2 8BS

UK

2) You complete and return the copyright transfer form:

http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR_ctf.pdf

Alternatively, Parasitology offers authors the option to publish their article through an Open Access model (Cambridge Open Option, see <http://journals.cambridge.org/action/displaySpecialPage?pageId=4576> for details),

on payment of a one-off fee. If you wish to do this, please send an e-mail stating this choice to parasitology@cambridge.org and complete and return the alternative copyright transfer and order form which can be accessed by clicking the link below:
http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR_ctf_oa.pdf

If you choose to publish Open Access, you will be contacted shortly by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect the Article Processing Charges (APCs). Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

PLEASE ALSO EMAIL THE ADMIN ASSISTANT, ALISON SAGE (parasitology@cambridge.org), TO INFORM HER WHEN YOU HAVE SENT IN YOUR COPYRIGHT FORM, AND OF YOUR DECISION REGARDING OPEN ACCESS.

Your manuscript cannot be processed until all the above have been received.

Yours sincerely,

Prof. Andrew Hemphill

EditorParasitology