



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

Carolina Miguel Fraga

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA *in vitro* DO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*
EXPOSTOS A UM DERIVADO BENZIMIDAZÓLICO, RCB20**

**Goiânia
2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

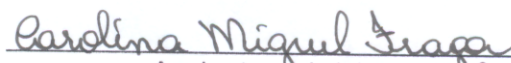
Nome completo do autor: Carolina Miguel Fraga

Título do trabalho: Avaliação bioquímica *in vitro* do metabolismo energético de cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos a um derivado benzimidazólico, RCB20

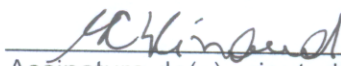
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 26 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

Carolina Miguel Fraga

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA *in vitro* DO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*
EXPOSTOS A UM DERIVADO BENZIMIDAZÓLICO, RCB20**

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marina Clare Vinaud

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria de Castro

**Goiânia
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Fraga, Carolina Miguel

Avaliação bioquímica in vitro do metabolismo energético de
cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos a um derivado
benzimidazólico, RCB20 [manuscrito] / Carolina Miguel Fraga. - 2015.
xix, 75 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marina Clare Vinaud; co-orientadora Dra.
Ana Maria de Castro.

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. Apêndice.

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

1. *Taenia crassiceps*. 2. metabolismo energético. 3. RCB20. 4.
sulfóxido de albendazol. I. Vinaud, Marina Clare, orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail :

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE CAROLINA MIGUEL FRAGA

- Aos vinte e três dias do mês de fevereiro do ano de 2015 (23/02/2015), às 13:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MARINA CLARE VINAUD, APARECIDO DIVINO DA CRUZ, TATIANE LUIZA DA COSTA, JOSÉ CLECILDO BARRETO BEZERRA e ÉVERTON KORT KAM FERNANDES, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA *in vitro* DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* EXPOSTOS A UM DERIVADO BENZIMIDAZÓLICO, RCB20”**, em nível de DOUTORADO, área de concentração em PARASITOLOGIA, de autoria de CAROLINA MIGUEL FRAGA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. MARINA CLARE VINAUD, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marina Clare Vinaud
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
Profa. Dra. Tatiane Luiza da Costa
Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra
Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes

Aprovada / Reprovada

APROVADA
APROVADA
APROVADA
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Profa. Dra. Marina Clare Vinaud (IPTSP/UFG) Marina Clare Vinaud

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (PUC/GO) Aparecido Divino da Cruz

Profa. Dra. Tatiane Luiza da Costa (HC/UFG) Tatiane Luiza da Costa

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra (IPTSP/UFG) José Clecildo Barreto Bezerra

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UFG) Éverton Kort Kamp Fernandes

Secretário da Pós-Graduação: José Clementino de Oliveira Neto

Dedico este trabalho a meus pais, Ademar e Leila, minhas irmãs, Mariana e Gabriela, ao meu sobrinho Francisco, ao meu namorado Pedro e todos parentes e amigos que vibram e oram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estudo e trabalho.

Aos meus pais, minha eterna gratidão por sempre terem me orientado e me apoiado. À Gláucia, às minhas irmãs e a querida família Pitombo por sempre estarem ao meu lado, auxiliando-me e torcendo por mim. Ao vovô Manuel, a vovó Aparecida, aos meus tios e tias, primos e primas pelas orações.

À tia Totó, Maria Erlan, Fernando, Ecione, Luiz, Núbia e Rubiana com quem pude dividir muitas alegrias.

A minha *hermana mayor* Ely Segura, agradeço pela amizade e pela acolhida.

A minha família mexicana: Sr. Miguel Herrera, Sra. Maria de la Luz Juárez (Maestrita), Álvaro Miguel Herrera, Leticia Herrera, Israel Mendoza e Erik Miguel Herrera por me proporcionarem quatros meses inesquecíveis.

As queridas Missionárias Scalabrinianas: Giuliana, Rose, Lorella e Regina que me acolheram com muito amor.

Aos meus grandes amigos mexicanos: Alberto G. Flores, Luz Gisela M. García, Brenda Jimenez e José de Jesús M. González, por todo carinho e amizade.

Ao Dr. Juan Luis Rendón e a Dra. Patrícia Del Arenal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Nacional Autônoma do México, por me receberem em seu laboratório e me ensinarem bioquímica, com muito carinho e paciência.

Ao Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dra. Alicia Hernández Campos, da Faculdade de Química, da Universidade Nacional Autônoma do México, por nos cederem o composto testado.

Ao Dr. Javier Ambrósio e a Dra. Olivia Reynoso, da Faculdade de Medicina, da Universidade Nacional Autônoma do México, pela parceria e amizade.

As minhas orientadoras e aos professores do Laboratório de Estudo da Relação Parasito-Hospedeiro (LAERPH).

A todos os amigos e colegas do LAERPH que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTSP/UFG.

Aos animais utilizados neste trabalho.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	xix
Lista de tabelas do artigo 2	ix
Lista de figuras.....	ix
Lista de figuras do artigo 1	ix
Lista de figuras do artigo 2	x
Lista de apêndices.....	xiii
Lista de anexos.....	xiii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Características do Parasito.....	1
1.2-Epidemiologia.....	3
1.3-Fármacos anti-helmínticos.....	4
1.3.1-Albendazol	4
1.3.2-RCB20: 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol.....	6
1.4-Metabolismo	8
1.4.1-Cestoide adulto	8
1.4.2-Larva metacestoide	11
2-JUSTIFICATIVA	13
3-OBJETIVOS.....	14
3.1-Objetivo geral	14
3.2-Objetivos específicos.....	14
4-MÉTODOS.....	15
4.1-Manutenção do ciclo biológico de <i>T. crassiceps</i>	15
4.2-Cultivo dos cisticercos e exposição aos fármacos	15
4.3-Dosagens bioquímicas	16
4.4-Análise de ácidos orgânicos	16
4.4.1-Extração dos ácidos orgânicos.....	16
4.4.1.1- Amostras de meio de cultura.....	16
4.4.1.2-Amostras de fluido vesicular.....	16

4.4.2-Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
4.5-Análise estatística	17
5-ARTIGOS	18
Artigo 1 – Avaliação do metabolismo de carboidratos de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> (cepa ORF) após tratamento in vitro com o derivado benzimidazólico RCB20	20
Resumo.....	20
1-Introdução	21
2-Metodologia	22
3-Resultados e Discussão	24
4-Bibliografia	34
Artigo 2 – Vias alternativas de produção de energia de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> (cepa ORF) expostos ao derivado benzimidazólico RCB20.....	37
Resumo.....	37
1-Introdução	39
2-Metodologia:	40
3-Resultados e Discussão	42
4-Bibliografia	48
6-CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICES	62
ANEXOS	70

TABELAS, FIGURAS, APÊNDICES E ANEXOS

Lista de tabelas do artigo 2

Tabela 1: Concentrações médias de produtos do metabolismo secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20)..... 43

Tabela 2: Concentrações médias de produtos do metabolismo produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20).. 44

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo biológico de *Taenia crassiceps* 3

Figura 2: Estruturas moleculares de ABZSO e RCB20 7

Figura 3: Via de degradação de glicose, por cestoides adultos, em anaerobiose. 10

Figura 4: Via de degradação de glicose pelo cisticerco de *T. crassiceps*..... 12

Lista de figuras do artigo 1

Figura 1: Concentrações médias de produtos de metabolismo secretados/excretados detectados no meio de cultura de cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20) 25

Figura 2: Concentrações médias de produtos da glicólise detectados em cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20) 26

Figura 3: Concentrações médias de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes

concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20) 29

Figura 4: Concentrações médias de ácidos orgânicos detectados no fluido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20) 30

Figura 5: Concentrações médias de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20) 31

Figura 6: Concentrações médias de ácidos orgânicos detectados no fluido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). 32

Lista de figuras do artigo 2

Figura 1: Formação de β -hidroxibutirato 45

Figura 2: Produção de succinato a partir de propionato 46

Figura 3: Ciclo da ureia 47

Lista de apêndices

Cromatograma 1: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos presentes no meio RPMI.	62
Cromatograma 2: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio inicial, pertencente ao grupo controle.....	62
Cromatograma 3: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio larval, pertencente ao grupo controle.	63
Cromatograma 4: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio final, pertencente ao grupo controle.	63
Cromatograma 5: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio inicial, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5µM.....	64
Cromatograma 6: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio larval, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5µM.....	64
Cromatograma 7: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio final, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5µM.....	65
Cromatograma 8: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio inicial, tratados com sulfóxido de albendazol a 13µM.....	65
Cromatograma 9: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio larval, tratados com sulfóxido de albendazol a 13µM.....	66
Cromatograma 10: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio final, tratados com sulfóxido de albendazol a 13µM.	66
Cromatograma 11: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio inicial, tratados com RCB20 a 6,5µM.....	67
Cromatograma 12: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio larval, tratados com RCB20 a 6,5µM.....	67
Cromatograma 13: Detecção <i>in vitro</i> de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em estágio final, tratados com RCB20 a 6,5µM.....	68

Cromatograma 14: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, tratados com RCB20 a 13µM..... 68

Cromatograma 15: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, tratados com RCB20 a 13µM..... 69

Cromatograma 16: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, tratados com RCB20 a 13µM..... 69

Lista de anexos

Aprovação do Comitê de Ética..... 70

Partial reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs..... 71

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C: graus Célsius

µL: microlitros

µM: micromolar

ABZSA: albendazol sulfona

ABZSO: sulfóxido de albendazol

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

CYP-450: citocromo P 450

g: força gravitacional

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HCl: ácido clorídrico

IPTSP: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

KBS: Kellog Biological Station

L: litro

LDH: lactato desidrogenase

M: molaridade (mol/L)

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

ORF: original red fox

pH: potencial hidrogeniônico

RCB20: 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

S/E: secreção/excreção

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

Tris-HCl: cloridrato de hidroximetil-aminometano

UFG: Universidade Federal de Goiás

WFU: Wake Forest University

RESUMO

Infecções humanas por cisticercos de *Taenia* spp. podem ser mais frequentes do que são comumente documentadas, especialmente em imunodeprimidos e se a localização dos parasitos não envolver órgãos vitais. O albendazol é um dos fármacos utilizados no tratamento dessas infecções e seu uso em tratamentos em massa pode acelerar o desenvolvimento de resistência, tanto em animais quanto em humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* as alterações bioquímicas em cisticercos de *T. crassiceps*, após tratamento com um derivado benzimidazólico, o RCB20. Os cisticercos foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas com 30 dias de infecção, classificados macroscopicamente e semeados em placas de microcultivo de 6 poços. Trinta cisticercos de cada estágio foram colocados em poços acrescido de 5mL de meio RPMI suplementado e acrescido de sulfóxido de albendazol (ABZSO) (6,5 μ M e 13 μ M) ou RCB20 (6,5 μ M e 13 μ M). Após 24 horas de cultivo, separou-se os cisticercos do meio de cultura e foram congelados em nitrogênio líquido. Foram realizadas análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e espectrofotometria para avaliação do metabolismo energético e respiratório. Observou-se uma dificuldade dos cisticercos em secretar os produtos de seu metabolismo devido a grandes diferenças nas concentrações de metabólitos secretados e detectados no fluido vesicular. Isso ocorreu devido a interferência dos fármacos na formação de tubulinas. Com relação à glicólise observou-se um aumento gradativo na secreção/excreção (S/E) de glicose em ambas concentrações de ABZSO e RCB20 testadas. Observou-se também uma preferência pela via aeróbia de produção de energia devido a não detecção da S/E de lactato nas amostras tratadas com ABZSO e RCB20; enquanto que no conteúdo vesicular observou-se diminuição nas concentrações de lactato. Com relação ao metabolismo energético e ciclo do ácido cítrico, observou-se seu funcionamento no sentido tradicional devido a detecção de alfa-cetoglutarato. Observou-se aumento nas concentrações de citrato, malato, fumarato e succinato nos grupos tratados com ABDZSO e RCB20. As vias alternativas de produção de energia como a beta-oxidação de ácidos graxos e o catabolismo de proteínas foram detectadas, com um aumento da concentração dos metabólitos dessas vias nos grupos tratados. Conclui-se assim, que apesar de não promoverem o bloqueio total na captação de glicose, os ABZSO e o RCB20 influenciaram em sua captação, induzindo o parasito a utilizar vias alternativas de produção de energia, com as vias de oxidação de ácidos graxos e de degradação de

proteínas. Além disso, apesar de mais solúvel e estável o RCB20 não demonstrou atividade bioquímica diferente do ABZSO.

Palavras chaves: *Taenia crassiceps*, metabolismo energético, RCB20, sulfóxido de albendazol

ABSTRACT

Human infections caused by *Taenia* spp may be more frequent than they are reported especially if occurred in immunodepressed patients and if the location of the parasites does not involve vital organs. Albendazole is one of the drugs used in the treatment of such infections and its use in mass treatment campaigns may accelerate the resistance development from the parasites both in humans and animal hosts. The aim of this study was to *in vitro* evaluate the biochemical alterations in *T. crassiceps* cysticerci after the treatment with a benzimidazolic derivatice (RCB20). The cysticerci were removed from the peritoneal cavity of BALB/c mice with 30 days of infection, macroscopically classified and harvested into 6 well culture plates. 30 cysticerci from each development stage in each well received 5mL of supplemented RPMI culture medium which contained sulfoxide albendazole (ABZSO) (6,5 μ M or 13 μ M), or RCB20 (6,5 μ M or 13 μ M). After 24h of culture the cysticerci were removed from the culture medium and both were frozen in liquid nitrogen. Liquid chromatography of high performance and spectrophotometric analysis were performed. It was possible to observe a difficulty in the secretion of substances by the treated cysticerci due to differences in the concentrations of the products dosed from the vesicular fluid and from the culture medium. This was an effect from the mode of action of the drugs which affects the tubulin formation. Regarding the glycolysis it was possible to observe a gradation increase in the secretion/excretion (S/E) of lactate in the treated groups while there was a decrease of this organic acid in the vesicular fluid. As to the energetic metabolism and the citric acid cycle it was possible to observe its traditional sense functioning due to the detection of α -ketoglutarate. It was possible an increase in the concentrations of citrate, malate, fumarate and succinate in the treated groups. The alternative pathway of energy production such as beta-oxidation of fatty acids and protein catabolism were detected with an increase in the metabolites from those pathways in the treated groups. Therefore we conclude that in spite of not blocking the glucose uptake the drugs influenced its uptake which lead to the use of alternative pathways of energy production. In spite of more soluble and stable the RCB20 formulation did not present a different biochemical effect than ABZSO.

Key words: *Taenia crassiceps*, energetic metaolibsm, RCB20, albendazole sulfoxide

1. INTRODUÇÃO

1.1-*Características do Parasito*

O parasito *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800) Rudolphi, 1810 pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, família *Taeniidae* (FREEMAN, 1962; WILLMS & ZURABIAN, 2010).

Entre os invertebrados, há relatos de que a *T. crassiceps* seja o parasito de maior capacidade reprodutiva. Algumas cepas têm sido isoladas e usadas em laboratório. São elas: HYG, KBS, Toi, ORF, COLA, GIKS e mais recente WFU, isolada em roedores na América do Norte (RIETSCHEL, 1981; EVERHART et al., 2004; WILLMS & ZURABIAN, 2010). Estes cisticercos possuem cerca de 5 mm de diâmetro, com escólex invaginado (cepas HYG, KBS, Toi, COLA, GIKS e WFU), sendo capazes de dar origem ao helminto adulto, ou apenas possuem o canal do escólex (cepa ORF), sendo incapazes de dar origem ao helminto adulto. Porém, todas as cepas são capazes de reproduzir-se assexuadamente, através da formação de brotamentos na superfície de sua membrana (FREEMAN, 1962; MAILLARD et al., 1998; VINAUD, 2007).

A cepa ORF é considerada uma cepa estéril, isto é, é incapaz de dar origem ao helminto adulto (WILLMS & ZURABIAN, 2010), porém, ela é capaz de reproduzir-se assexuadamente, por brotamentos em sua membrana. Os cisticercos podem, então, ser classificados, segundo seu estágio evolutivo, em inicial, larval e final, de acordo com características morfológicas. No estágio inicial, a membrana cística apresenta-se translúcida e sem brotamentos; no estágio larval, apresenta-se translúcida e com brotamentos, indicando atividade reprodutiva e, no estágio final, apresenta-se opaca e sem brotamentos (VINAUD et al., 2007).

Os hospedeiros definitivos deste cestóide são animais silvestres, tais como raposas árticas (*Vulpes lagopus*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*) e doninhas (*Mustela* sp), podendo infectar cães (*Canis familiares*) e, mais raramente, gatos domésticos (*Felis catus*) (WÜNSCHMANN et al., 2003; SAEED et al., 2006; BAGRADE et al., 2009; BALLWEBER et al., 2009; STIEN et al., 2010; WILLMS & ZURABIAN, 2010; BRUŽINSKAITĖ-SCHMIDHALTER et al., 2012; LI et al., 2013). Quando na sua forma adulta, mede de 7 a 14 cm de comprimento, tem o corpo com achatamento dorso-ventral, segmentado em proglotes hermafroditas. Seu escólex é

esférico, com duas coroas de acúleos (32 a 36 por fileira) e quatro ventosas laterais (FREEMAN, 1962; MAILLARD et al., 1998; WILLMS & ZURABIAN, 2010).

Infecções naturais com sua forma larval, também denominada de *Cysticercus longicollis* Rudolphi, 1810, têm sido relatadas em roedores silvestres, tais como ratazanas (*Microtus arvalis*), marmotas (*Marmota monax*) e chinchilas (*Chinchilla lanígera*) (WILLMS & ZURABIAN, 2010; BASSO et al., 2014). O gênero *Taenia* contém cerca de 40 espécies e 4 subespécies (HOBERG, 2002). Analisando a ordem Cyclophyllidea, observa-se que os parasitos pertencentes a família *Taeniidae* são os únicos que possuem mamíferos como hospedeiros definitivos e intermediários. Sendo assim, sua transmissão é ecologicamente baseada em ciclos de vida ligados a associações específicas entre predadores e presas (HOBERG, 2000).

As formas adultas de *T. crassiceps* habitam, principalmente, o terço médio do intestino dos hospedeiros definitivos (canídeos silvestres e domésticos), os quais eliminam em suas fezes as proglotes grávidas, repletas de ovos, que contaminam o meio ambiente, podendo ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários (humanos e roedores silvestres). Ao alcançar o trato digestório dos hospedeiros intermediários, liberam o embrião hexacanto, que penetra na mucosa e migra pelo organismo, por via hemato-linfática, e se aloja em órgãos e cavidades, tais como região subcutânea, cavidades pleural e abdominal, musculatura esquelética, sistema nervoso central e globo ocular. O embrião se desenvolve em larva metacestoide ou cisticerco, que se multiplica assexuadamente por brotamentos, podendo chegar a 11 mm de diâmetro. Apesar de apresentarem o canal do escólex, muitos brotamentos não apresentam o escólex, sendo incapazes de dar origem ao helminto adulto, porém, são capazes de seguir reproduzindo-se assexuadamente por brotamentos. Quando as larvas metacestoides são ingeridas pelo hospedeiro definitivo, se desenvolvem em helminto adulto. E a partir de 5 semanas de infecção, os ovos podem ser encontrados em suas fezes. A infecção se mantém por até 9 meses, evoluindo para cura espontânea (Figura 1) (FREEMAN, 1962; MAILLARD et al., 1998).

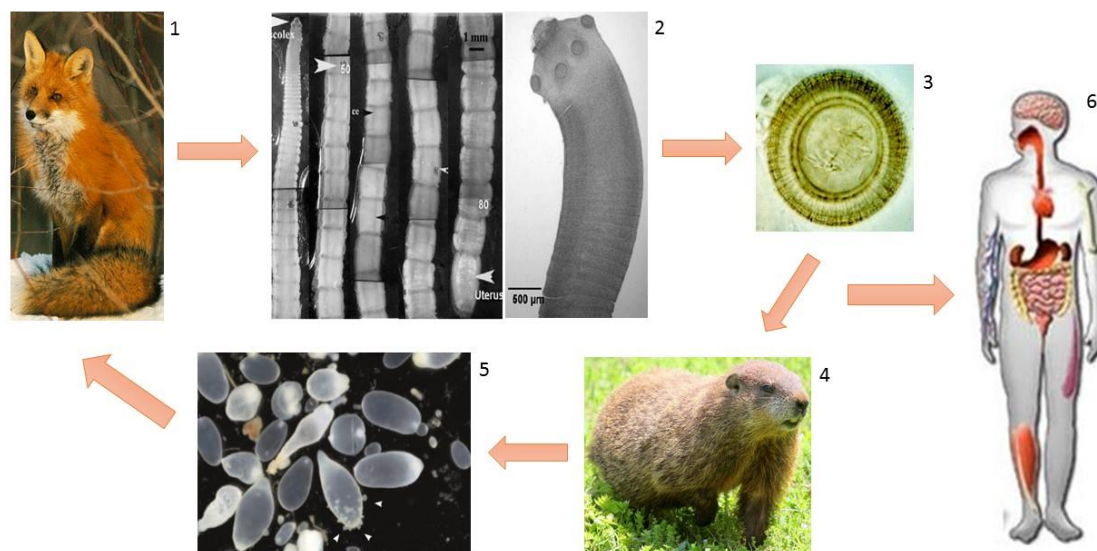


Figura 1: Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. 1: hospedeiro definitivo (canídeos silvestres e domésticos); 2: helminto adulto; 3: ovo de *Taenia* sp; 4: hospedeiros intermediários (roedores silvestres); 5: forma larval; 6: hospedeiro intermediário acidental (homem) (adaptado de FREEMAN, 1962; VINAUD, 2007)

1.2-Epidemiologia

A cisticercose por *T. crassiceps* é uma doença rara em animais domésticos, ocorrendo principalmente nos Estados Unidos e na Europa Ocidental (CHERMETTE et al., 1993; HOBERG et al., 1999; WÜNSCHMANN et al., 2003; BALLWEBER, 2009).

Infecções humanas por cisticercos de *Taenia* spp. podem ser mais frequentes do que são comumente documentadas, principalmente se a localização dos parasitos não envolver órgãos vitais. As infecções geralmente são determinadas por ciclos sinantrópicos ou quando o parasito tem como hospedeiros definitivos cães e gatos domésticos (HOBERG et al., 2000 e 2002).

A cisticercose humana por *T. crassiceps* é incomum, porém tais infecções são potencialmente graves, devido à natureza proliferativa dos cisticercos e sua localização. A presença de grandes populações de roedores e raposas pode contribuir para a disseminação desta infecção (HOBERG et al., 2000 e 2002).

Um dos primeiros casos humanos foi descrito por Shea et al. (1973), que diagnosticou uma infecção intraocular em uma mulher imunocompetente. Outros casos

de infecção intraocular em indivíduos imunocompetentes foram relatados por Arock-Mettinger et al. (1992) e Chuck et al. (1997), na Alemanha. Ainda na Alemanha, Ntoukas et al. (2013) relataram um caso de cisticercose cerebelar, em uma mulher de 51 anos. Nestes casos a infecção por *T. crassiceps* foi confirmada pela morfologia dos cisticercos, por análises de Western-Blott e biologia molecular.

Entretanto, a maioria dos casos relatados está relacionada a algum tipo de imunodepressão, como infecções por HIV, hepatite C, linfomas e quimioterapia. Nestes relatos, foram detectados cisticercos na região subcutânea e intramuscular. Há relatos de casos na Alemanha (KLINKER et al., 1992; HELDWEIN et al., 2006), Suíça (GOESSERINGER et al., 2011) e França (CHERMETTE et al., 1995; FRANÇOIS et al., 1998; MAILLARD et al., 1998).

Nestes casos relatados, o tratamento com albendazol e praziquantel se mostrou eficaz, quando combinados com remoção cirúrgica (CHERMETTE et al., 1995; FRANÇOIS et al., 1998; MAILLARD et al., 1998; HELDWEIN et al., 2006). Devido à baixa biodisponibilidade e absorção no trato gastrointestinal do albendazol (PALOMARES-ALONSO et al., 2010), em alguns casos, as interferências cirúrgicas são invasivas, requerendo assim um maior acompanhamento do paciente (GOESSERINGER et al., 2011).

1.3-Fármacos anti-helmínticos

1.3.1-Albendazol

O albendazol é um benzimidazol desenvolvido há mais de 20 anos. Tem um importante papel no tratamento de infecções por nematelmintos e platelmintos, especialmente sobre os cestóides. Tem grande eficácia sobre *Taenia* sp e *Hymenolepis diminuta*; e protoescoléces de *Echinococcus* são rapidamente eliminados (VENKATESAN, 1998; SCHMIDT, 1998).

Este fármaco é inicialmente oxidado a sulfóxido de albendazol (ABZSO), sua forma ativa e, em seguida, oxidado a albendazol sulfona (ABZSA), sua forma inativa. Sua forma ativa se liga à β -tubulina dos parasitos, inibindo a polimerização dos microtúbulos. Como consequência, altera o tegumento dos parasitos, alterando o processo de transporte de substâncias, como a glicose, através de seu tegumento (SCHMIDT, 1998; VENKATESAN, 1998; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013).

Os microtúbulos são estruturas cilíndricas encontradas em células eucariotas, que estão envolvidas em muitos processos celulares, como mitose, motilidade de cílios e flagelos, formação de vesículas intracelulares, organelas e também estão presentes no citoesqueleto celular. São formados por duas proteínas celulares, α -tubulina e β -tubulina, as quais têm massa semelhante e formam estruturas heterodiméricas (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Alguns autores, como Freedman et al. (2011), têm proposto maiores estudos acerca das variantes da β -tubulina, para melhor caracterização de suas interações, bem como sua utilização como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. No caso do albendazol, sabe-se que o seu alvo é a β -tubulina isovariante 2 (CHAMBERS et al., 2010).

A susceptibilidade dos platelmintos ao albendazol é muito variável. *Taenia* sp e *Hymenolepis diminuta* são rapidamente eliminados em infecções intestinais, enquanto outras espécies como *H. microstoma* pouco respondem ao tratamento. Além disso, infecções por *Echinococcus multilocularis* requerem tratamento de longa duração para impedir a proliferação de cistos hidáticos teciduais (WEN et al., 1993; HORTON, 1997; SCHMIDT, 1998).

Schmidt (1998), em estudo realizado com formas adultas de *H. microstoma*, *Echinostoma caproni* e *Schistosoma mansoni*, observou que, no grupo não tratado, os parasitos mobilizaram o glicogênio para a produção de ovos, enquanto no grupo tratado com albendazol, o glicogênio permaneceu armazenado sob forma de vacúolos, em seu tegumento. A forma ativa do albendazol, além de induzir múltiplos efeitos na divisão celular e na absorção de nutrientes, afetou também a síntese e secreção de glicoconjugados, pois a integridade e organização dos retículos endoplasmáticos e do complexo de Golgi, também requerem microtúbulos.

Estudos *in vitro* com cisticercos de *T. crassiceps*, realizados por Palomares et al. (2006) e Trejo-Chávez et al. (2011) relatam que o tratamento com albendazol provocou colapso no parasito, alterando sua forma, reduzindo seu conteúdo vesicular. Além de provocar o desaparecimento de microvilosidades, alterações na camada germinativa tegumentar e alterações ultra-estruturais nos protonefrídeos e microtríquias.

Estudos realizados com cisticercos de *T. crassiceps* expostos ao albendazol demonstram que, *in vitro*, este fármaco diminui a excreção de lactato pelo parasito,

levando a uma preferência por vias aeróbias de produção de energia (VINAUD et al., 2008 e 2009) e *in vivo*, isto é, após o tratamento do hospedeiro, aumentou a produção de oxaloacetato e α -cetoglutarato, assim como induziu à utilização de ácidos graxos como fonte alternativa de energia, observada pelo aumento na produção de β -hidroxibutirato e propionato (FRAGA et al., 2012a e 2012b).

O albendazol induz a ativação de proteínas do complexo CYP-450, responsáveis pelo seu metabolismo. Tem baixa absorção oral, após uma dose de 400mg, o nível máximo de ABZSO é de cerca de 0,04-0,55 mg/L, com grande variação entre indivíduos. Sua meia vida é de 9 horas e 70% da molécula está ligado a proteínas (VENKATESAN, 1998; HORTON, 2000; DAYAN, 2003).

Os efeitos adversos do albendazol são poucos e tendem a ser suaves. Podem ocorrer: desconforto gastrointestinal, tontura, erupções na pele e alopecia. O uso prolongado de albendazol leva a um aumento progressivo, porém reversível, das transaminases hepáticas, requerendo, assim, um monitoramento e, em alguns casos, a suspensão do tratamento (VENKATESAN, 1998; HORTON, 2000; DAYAN, 2003).

Por serem de baixo custo, os benzimidazóis são muito utilizados no tratamento de infecções por cestoides e nematoides. Porém, o aumento do uso em tratamentos em massa pode acelerar o desenvolvimento de resistência, tanto em animais (EL-ON, 2003; LOPES et al., 2014) como em humanos (ENDEN, 2009; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2012), sendo assim necessário o desenvolvimento de novos fármacos.

1.3.2-RCB20: 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol

Derivados de benzimidazóis, tais como albendazol e mebendazol, são amplamente utilizados no tratamento de diversas helmintíases. Porém, requerem doses elevadas e longo período de tratamento, devido à baixa solubilidade e biodisponibilidade destes compostos, especialmente no tratamento de infecções teciduais (NAVARRETE-VÁZQUEZ et al., 2001; ROJAS-AGUIRRE et al., 2011).

A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes anti-parasitários, a equipe do Dr. Rafael Castillo Bocanegra, do Departamento de Farmácia, da Faculdade de Química, da Universidade Nacional Autônoma do México, sintetizou quatro derivados benzimidazólicos, os quais foram testados, *in vitro*, para o tratamento de *Giardia*

intestinalis, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana* e *Trichinella spiralis*. (NAVARRETE-VÁZQUEZ et al., 2001, 2003 e 2006; ROJAS-AGUIRRE et al., 2011; HERNÁNDEZ-LUIS et al., 2010).

Um desses derivados, o 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20) apresentou um perfil antiparasitário semelhante ao albendazol. Possui um grupo naftiloxi, na posição 5, um cloro na posição 6 e um grupo trifluorometil na posição 2 do anel benzimidazólico (Figura 2) (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). É um composto mais solúvel que o albendazol, porém ao ser combinado com ciclodextrinas, torna-se mais estável e com uma maior biodisponibilidade (ROJAS-AGUIRRE et al., 2011).

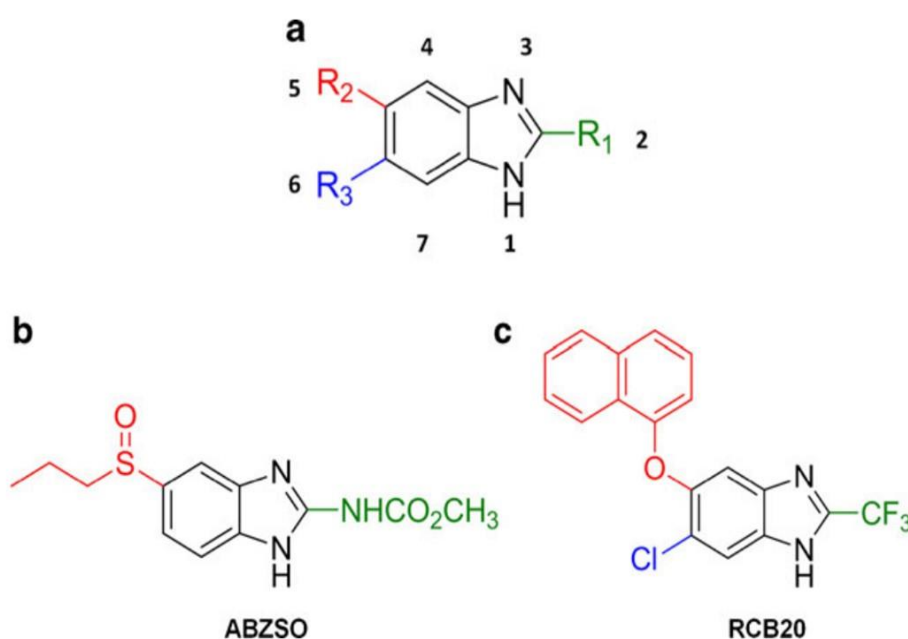


Figura 2: Estruturas moleculares de ABZSO e RCB20, a) Sistema benzimidazol mostrando o número e as posições de cada molécula; b) Molécula de ABZSO, com grupo sulfóxido na posição 5 e grupo carbamato na posição 2; c) Molécula de RCB20, com um grupo naftoloxi na posição 5, um grupo trifluorometil na posição 2 e um cloro na posição 6 (adaptado de MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013)

Um estudo realizado por Márquez-Navarro et al. (2013) comparou a atividade *in vitro* de RCB20 e ABZSO, em cisticercos de *T. Crassiceps* da cepa ORF, analisando a distribuição de células flama e expressão de proteínas de citoesqueleto, tais como actina, miosina II e tubulina. Utilizando técnicas de análise de ultraestruturas,

imunofluorescência e imunohistoquímica, observaram modificações na expressão de α -tubulina tirosinada, sugerindo que o composto altera, de forma ainda não definida, o ciclo de tirosinação da α -tubulina.

Márquez-Navarro et al. (2013) observaram que o tratamento com o RCB20 alterou os cílios das células flamas, o que provavelmente levou a morte dos cisticercos. Além disso, sugerem que o composto tem o modo de ação diferente do ABZSO, pois parece induzir alterações em tubulinas acetiladas ou tirosinadas por interação direta com as proteínas, promovendo assim, o rompimento dos microtúbulos. Apesar de comprovada a sua eficácia como antiparasitário contra *T. crassiceps*, ainda não foi estudado o impacto do RCB20 no metabolismo de cisticercos.

1.4-Metabolismo

Cada espécie de parasito e seus estádios evolutivos possuem seus próprios padrões metabólicos, os quais têm evoluído para que o parasito melhor se adeque às condições ambientes, dentro e fora do hospedeiro (KÖHLER & VOIGT, 1988).

Estudos têm demonstrado que, além de carboidratos, aminoácidos e vitaminas, os parasitos utilizam como nutrientes bases purinas, nucleosídeos, esteróis, ácidos graxos e porfirinas. Alguns platelmintos que não possuem trato digestivo também são capazes de absorver via tegumento macromoléculas exógenas, principalmente proteínas, que são utilizadas como componentes estruturais. Depois de absorvidos, os nutrientes são hidrolisados enzimaticamente em seus constituintes básicos (aminoácidos, monossacarídeos e nucleotídeos) (KÖHLER & VOIGT, 1988).

Como outros animais, os parasitos necessitam de nutrientes exógenos para manter sua sobrevivência, crescimento e reprodução e, diferentemente dos organismos de vida livre, sua nutrição depende de outro organismo, isto é, de seu hospedeiro. Seu metabolismo torna-se complexo, por habitarem vários tipos de tecidos e órgãos, e, às vezes, ambientes muito distintos durante seu ciclo de vida (KÖHLER & VOIGT, 1988).

1.4.1-Cestoide adulto

A absorção de nutrientes, pelos cestoides, ocorre através da membrana celular que faz parte do tegumento e que oferece enorme extensão superficial, por possuírem microvilosidades ou microtríquias. Os nutrientes são absorvidos por difusão simples, por transporte facilitado e por pinocitose. A membrana do tegumento é revestida por um

glicocálix e contém várias enzimas, tais como fosfatases, lipases e RNAses (REY, 2008).

Os carboidratos mais utilizados, como fonte de energia, são a glicose e a galactose. Possuem grandes reservas de glicogênio e amilopectinas, que estão armazenados principalmente nas células parenquimatosas e musculares, podendo constituir 10% do peso total do helminto (REY, 2008).

As vias bioenergéticas encontradas nos cestoides adultos são, geralmente, anaeróbias, pois vivem na cavidade intestinal do hospedeiro definitivo, onde o oxigênio é escasso. Processos oxidativos, como ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória, são ausentes ou parcialmente ativos. Como consequência, não são capazes de oxidar compostos orgânicos em CO₂ e água, porém, têm como produtos finais de seu metabolismo outros compostos, como ácidos graxos voláteis e lactato (KÖHLER & VOIGT, 1988).

Em anaerobiose, por meio da glicólise, a glicose é convertida em fosfoenolpiruvato, o qual pode ser convertido em piruvato, que é consequentemente convertido a lactato. De forma análoga, o fosfoenolpiruvato é convertido em oxaloacetato, sob a ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase, o qual é subsequentemente convertido a malato (Figura 3) (KÖHLER & VOIGT, 1988).

Através de um sistema de transporte ativo, o malato atinge a matriz mitocondrial e pode ser convertido em piruvato, o qual é subsequentemente utilizado na síntese de acetil-CoA, o qual pode tanto ser convertido em acetato como pode ser precursor de ácidos graxos voláteis. O malato pode ainda originar o fumarato, o qual é convertido a succinato, que subsequentemente participa da síntese de propionil-CoA, que pode tanto originar em propionato quanto ser precursor de ácidos graxos voláteis (Figura 3) (KÖHLER & VOIGT, 1988).

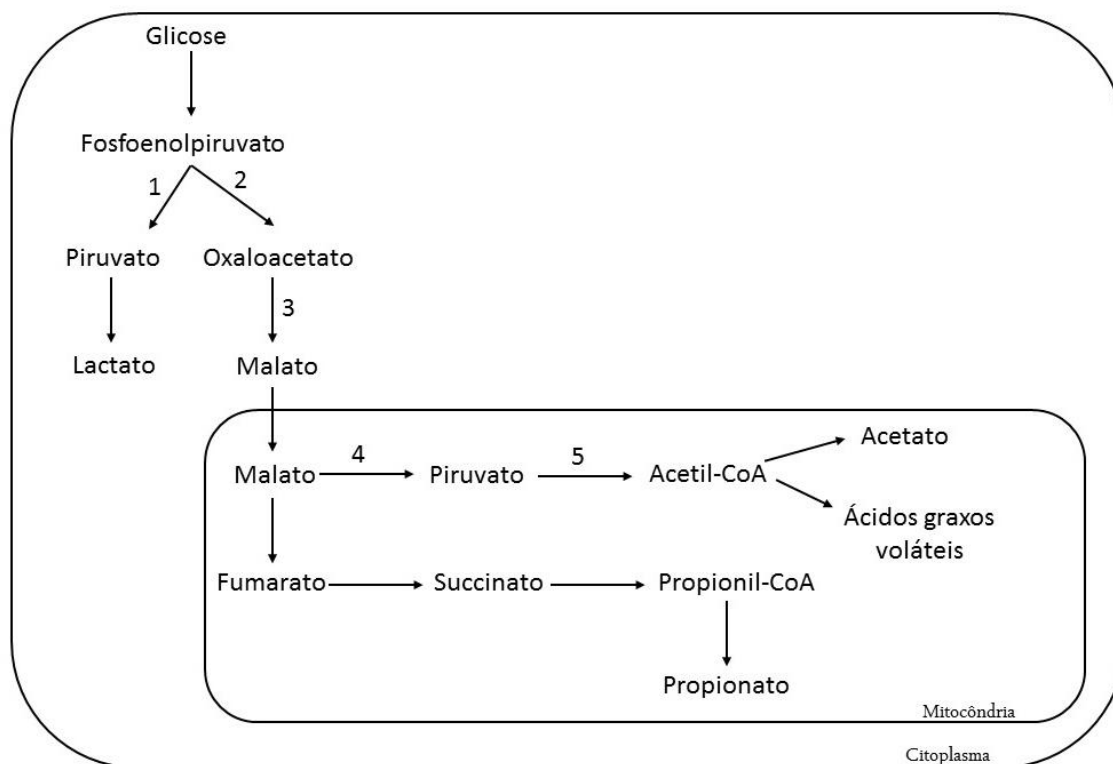


Figura 3: Via de degradação de glicose, por cestóides adultos, em anaerobiose, 1: piruvato quinase; 2: fosfoenol piruvato carboxiquinase; 3: malato desidrogenase citoplasmática; 4: enzima málica; 5: complexo piruvato desidrogenase (adaptado KÖHLER & VOIGT, 1988).

As vias glicolítica e de glicogênese são mais eficientes na presença de CO_2 . Isso se dá devido sua fixação, a qual é determinada pela grande atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e piruvato quinase, pela grande afinidade destas enzimas com os seus substratos, pela grande concentração de fosfoenolpiruvato e CO_2 nos tecidos do parasito, bem como pela grande concentração de malato desidrogenase citoplasmática (REY, 2008; KÖHLER & VOIGT, 1988).

A síntese de ácidos graxos voláteis, em alguns helmintos, também pode estar associada com a geração de energia. Estas reações ocorrem dentro da mitocôndria, e são semelhantes à inversão da β -oxidação dos ácidos graxos. Porém, as propriedades cinéticas de algumas enzimas envolvidas na produção de ácidos graxos por helmintos diferem das propriedades das enzimas envolvidas na produção de ácidos graxos por mamíferos (KÖHLER & VOIGT, 1988; FRAGA, 2011).

O aumento na eficiência de geração de energia observada em alguns helmintos pode torná-los mais flexíveis à adaptação energética em seus diferentes habitats. Os

ácidos graxos voláteis difundem-se facilmente através das membranas biológicas, portanto, são menos prejudiciais, tanto para o parasito quanto para o hospedeiro, do que o succinato e o lactato. O acúmulo de ácidos orgânicos também pode servir para controlar o pH intracelular, principalmente para os helmintos que habitam órgãos muito ácidos ou muito alcalinos, como o intestino delgado (KÖHLER & VOIGT, 1988; FRAGA, 2011).

1.4.2-Larva metacestoide

Os cisticercos de *T. crassiceps* se encontram em órgãos ou cavidades que possuem moderadas concentrações de oxigênio. Os carboidratos utilizados como fonte e reserva energética são, respectivamente, a glicose e o glicogênio. A degradação destas substâncias de reserva gera substratos que são utilizados em vias do metabolismo aeróbio (KÖHLER & VOIGT, 1988; CORBIN et al., 1998; VINAUD et al., 2007).

Assim, em aerobiose, no citoplasma, através da glicólise, a glicose dá origem a fosfoenolpiruvato que pode ser convertido a oxaloacetato, o qual é convertido a malato, que flui para dentro da matriz mitocondrial. O fosfoenolpiruvato, no citoplasma, pode ainda ser convertido a piruvato, que pode dar origem a malato citoplasmático ou entrar na mitocôndria. Dentro da mitocôndria, o malato pode originar oxaloacetato ou então ser o precursor do piruvato que dará origem ao acetil-CoA. O acetil-CoA pode combinar-se com o oxaloacetato e formar citrato. O acetil-CoA pode ainda ser o precursor do acetato. O citrato é convertido em isocitrato, o qual é subsequentemente convertido a α -cetoglutarato, que dará origem ao succinil-CoA, o qual é precursor do succinato. Em uma via inversa, o malato pode ainda ser convertido a fumarato, o qual é convertido a succinato, que atua como substrato da cadeia respiratória. Esta via inversa também é chamada via da enzima fumarato redutase (Figura 4) (ZENKA & PROKOPIC, 1987; ZENKA et al., 1987; CORBIN; et al., 1998; VINAUD et al., 2007).

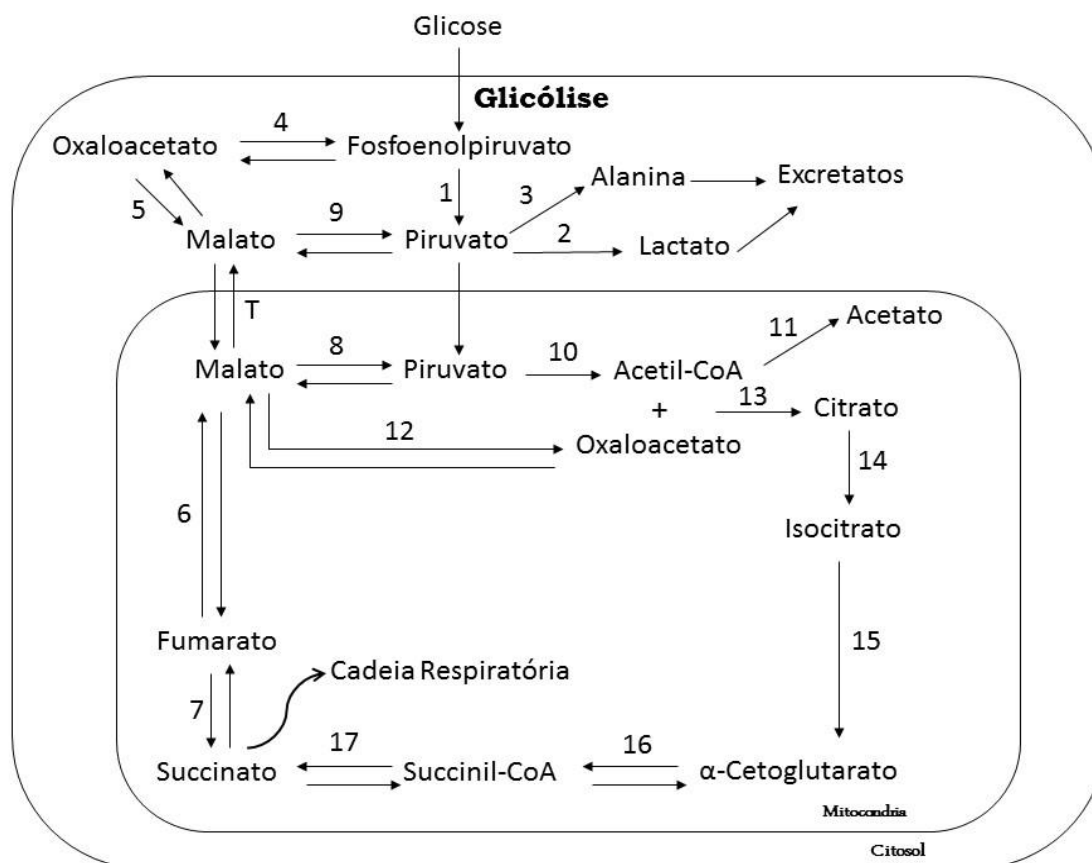


Figura 4: Via de degradação de glicose pelo cisticerco de *T. crassiceps*, T: substâncias com trânsito livre pela membrana mitocondrial; 1: piruvato quinase; 2: lactato desidrogenase; 3: alanina transferase; 4: fosfoenol piruvato carboxiquinase; 5: malato desidrogenase citosólica; 6: fumarase; 7: fumarato redutase; 8: enzima málica mitocondrial; 9: enzima málica citosólica; 10: complexo piruvato desidrogenase; 11: acetoacetato descarboxilase; 12: malato desidrogenase mitocondrial; 13: citrato sintase; 14: aconitase; 15: isocitrato desidrogenase; 16: α -cetoglutarato desidrogenase; 17: succinil-CoA sintetase (adaptado de CORBIN et al., 1998; LEHNINGER et al., 2007).

A detecção de atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase em cisticercos de *T. crassiceps* sugere a presença de via das pentoses fosfato ativa, sendo a glicose 6-fosfato desidrogenase a enzima mais ativa (RENDÓN et al., 2008). Estudo realizado por Del Arenal et al. (2001) mostrou que os cisticercos de *T. crassiceps* possuem cadeia transportadora de elétrons ativa e semelhante a do hospedeiro mamífero.

2. JUSTIFICATIVA

O albendazol é um benzimidazol desenvolvido há mais de 20 anos. Tem um importante papel no tratamento de infecções intestinais por nematelmintos e platelmintos, especialmente sob os cestoides. Entretanto, casos de resistência de cestoides ao tratamento com este fármaco já foram relatados, bem como sua baixa biodisponibilidade para tratamento de infecções teciduais. Diante deste problema, surgiram algumas tentativas de melhoramento molecular do fármaco.

A equipe do Dr. Rafael Castillo Bocanegra, do Departamento de Farmácia, da Faculdade de Química, da Universidade Nacional Autônoma do México, tem como objetivo pesquisar a síntese de fármacos, a fim de estabelecer os requisitos para sua atividade contra protozoários e helmintos em seres humanos e em animais domésticos.

A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, sua equipe sintetizou quatro derivados, os quais já foram testados, *in vitro*, para o tratamento de *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana* e *Trichinella spiralis*.

Dentre estes derivados, o 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20) apresentou um perfil antiparasitário semelhante ao descrito para o albendazol. É um composto mais solúvel e mais estável que o albendazol. Estudos comparativos do efeito do RCB20 em relação ao sulfóxido de albendazol demonstraram alterações na distribuição de células flama e expressão de proteínas de citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Apesar de comprovada a eficiência do RCB20 como antiparasitário contra *T. crassiceps*, ainda não estudou-se seu impacto no metabolismo de cisticercos, bem como de que forma as alterações no sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol influenciam no metabolismo energético e respiratórios dos parasitos. Assim, estudos do metabolismo dos parasitos, aliados a estudos moleculares, devem ser realizados para comprovar a atividade antiparasitária deste composto, bem como compreender seu mecanismo de ação.

3. OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral

Avaliar *in vitro* as alterações bioquímicas em cisticercos de *T. crassiceps* após tratamento com o derivado benzimidazólico 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20).

3.2-Objetivos específicos

1. Analisar, *in vitro*, pós-tratamento, a secreção/excreção (S/E) e a produção de ácidos orgânicos que indicam glicólise aeróbia (piruvato) e glicólise anaeróbia (lactato) pelos cisticercos, em seus diferentes estádios evolutivos.
2. Analisar, *in vitro*, pós-tratamento, a S/E e a produção de ácidos orgânicos que indicam o ciclo do ácido cítrico (oxaloacetato, citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato e malato) pelos cisticercos, em seus diferentes estádios evolutivos.
3. Analisar, *in vitro*, pós-tratamento, a S/E e a produção de ácidos orgânicos que indicam o metabolismo de ácidos graxos (acetato acetoacetato, β -hidroxibutirato e propionato) pelos cisticercos, em seus diferentes estádios evolutivos.
4. Analisar, pós-tratamento, as taxas de concentrações de: glicose, ureia, creatinina e proteínas totais secretadas/excretadas pelos cisticercos, em seus diferentes estádios evolutivos.

4. MÉTODOS

4.1-Manutenção do ciclo biológico de *T. crassiceps*

Tem se mantido, no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), desde 2002, o ciclo biológico de *T. crassiceps* (cepa ORF). Para a manutenção de seu ciclo biológico, inocularam-se 10 cisticercos em estágio inicial na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas, com cerca de 60 dias de idade. Após 90 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e necropsiados, os cisticercos retirados da cavidade peritoneal, lavados com solução fisiológica e, em seguida, outros 10 cisticercos em estágio inicial foram inoculados em outros animais, dando continuidade ao ciclo (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

Os camundongos receberam cuidados diários, água acidificada e ração padrão para a espécie à vontade. Obedeceu-se aos princípios éticos em experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CoEp/UFG) (protocolo número 011/11).

4.2-Cultivo dos cisticercos e exposição aos fármacos

Selecionou-se um animal de manutenção do ciclo biológico, e em câmara de fluxo laminar, fez-se a eutanásia e necropsia. Os cisticercos foram retirados da cavidade peritoneal, lavados em solução fisiológica para a retirada de células e quaisquer outros interferentes (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Em seguida, os cisticercos foram classificados macroscopicamente, de acordo com seu estágio evolutivo: inicial, larval e final (VINAUD et al., 2007; FRAGA et al., 2012a e 2012b)

Em placas de microcultivo de 6 poços, colocou-se 30 cisticercos de cada estágio evolutivo acrescido de 5 mL de meio RPMI (LGC Biotecnologia®) suplementado com: L-glutamina (Fisher Chemical®) a 200 mM, soro fetal bovino 10% inativado (Cultilab®), penicilina/estreptomicina (Vitalfarma®) a 1:1000, hepes (Vetec®) a 1 M e 2-mercaptoetanol (Gibco®) a 5 mM e acrescido de sulfóxido de albendazol (Sigma-Aldrich®) (6,5 µM ou 13 µM) ou RCB20 (6,5 µM ou 13 µM). Os parasitos foram incubados a 37°C em 5% de CO₂ e umidade relativa de 95%, por 24 horas (VINAUD et al., 2008 e 2009; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013).

O sulfóxido de albendazol e o RCB20 foram diluídos em DMSO, e para verificar a interferência deste diluente no metabolismo do parasito, fez-se o cultivo de 30 cisticercos, de cada estágio evolutivo, acrescentando-se, ao meio de cultura, o mesmo volume de DMSO utilizado para a diluição do fármaco. Além deste controle, fez-se o controle do meio RPMI, submetendo 5 ml de meio às mesmas condições de incubação (VINAUD et al., 2008 e 2009; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013).

Após as 24 horas de cultivo, separou-se os cisticercos do meio de cultura. Ambos foram congelados em nitrogênio líquido para estase das reações metabólicas (VINAUD et al., 2008 e 2009).

4.3-Dosagens bioquímicas

Utilizando-se o aparelho Architect C8000 Plus, por meio de análises espectrofotométricas, fez-se as dosagens das concentrações de glicose, ureia, creatinina e proteínas totais secretadas/excretadas pelos cisticercos.

4.4-Análise de ácidos orgânicos

4.4.1-Extração dos ácidos orgânicos

4.4.1.1- Amostras de meio de cultura

Os ácidos orgânicos secretados/excretados no meio de cultura foram extraídos utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), com o auxílio de uma caixa acoplada a uma bomba a vácuo. Esta coluna foi ativada com 1 mL de HCl a 0,5 M, 1 mL de metanol e 2 mL de água ultrafiltrada. Em seguida aplicou-se 2 mL de amostra e acrescentou-se 2 mL de água tipo I. Retirou-se a coluna da caixa, acrescentou-se 250 µL de H₂SO₄ a 0,5 M, e centrifugou-se a 626 g (2.000 rpm), por 5 minutos, a 4 °C (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

A amostra obtida foi armazenada à -20 °C para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.4.1.2-Amostras de fluido vesicular

Após a estase em nitrogênio líquido, os cisticercos foram descongelados e homogeneizados em 500 µL de tampão tris-HCl a 0,1 M, com pH 7,6, acrescido de inibidores de proteases (RENDÓN et al., 2004 e 2008). O extrato obtido foi centrifugado a 15.652 g (10.000 rpm), por 10 minutos, a 4 °C (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009).

Do sobrenadante obtido extraiu-se os ácidos orgânicos, utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), como descrito anteriormente no item 4.4.1.1.

A amostra obtida foi armazenada a -20 °C para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.4.2-Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras obtidas foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex HPX-87H. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico a 5 mM, com vazão de 0,6 mL/min, acoplado a um espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 210 nm. Para esta análise, utilizou-se 50 µL de cada amostra (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

Os resultados foram analisados pelo programa Star Chromatography Workstation (Agilent®), calibrado para identificação de ácidos orgânicos da via glicolítica (piruvato e lactato), do ciclo do ácido cítrico (oxaloacetato, citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato e malato) e do metabolismo de ácidos graxos (acetato, acetoacetato, β -hidroxibutirato, propionato) (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

4.5-Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quintuplicatas independentes. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Fez-se a estatística descritiva para determinação de média e desvio padrão, e, para avaliar as diferenças entre os grupos analisados, as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição normal, utilizou-se análise da variância. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (FRAGA et al., 2012a e 2012b).

5. ARTIGOS

Artigo 1 – Avaliação do metabolismo de carboidratos de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) após tratamento *in vitro* com o derivado benzimidazólico RCB20

Autores: FRAGA, C. M.¹; CASTILLO, R.²; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.²; AMBROSIO, J. R.³; REYNOSO-DUCOING, O.³; COSTA, T. L.⁴; BEZERRA, J.C.B.¹ CASTRO, A. M.¹; VINAUD, M. C.¹.

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Faculdade de Química, Departamento de Farmácia, Universidade Nacional Autónoma do México, Cidade do México, Estado do México, México.

³Faculdade de Medicina, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Nacional Autónoma do México, Cidade do México, Estado do México, México.

⁴Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Artigo 2 – Vias alternativas de produção de energia de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) expostos *in vitro* ao derivado benzimidazólico RCB20

Autores: FRAGA, C. M.¹; CASTILLO, R.²; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.²; AMBROSIO, J. R.³; REYNOSO-DUCOING, O.³; COSTA, T. L.⁴; BEZERRA, J.C.B.¹ CASTRO, A. M.¹; VINAUD, M. C.¹.

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Faculdade de Química, Departamento de Farmácia, Universidade Nacional Autónoma do México, Cidade do México, Estado do México, México.

³Faculdade de Medicina, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Nacional Autônoma do México, Cidade do México, Estado do México, México.

⁴Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Artigo 1 – Avaliação do metabolismo de carboidratos de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) após tratamento *in vitro* com o derivado benzimidazólico RCB20

Resumo

A cisticercose humana por *T. crassiceps* é incomum, porém tais infecções são potencialmente graves, devido à natureza proliferativa dos cisticercos e sua localização. O albendazol é um benzimidazol desenvolvido há mais de 20 anos. Tem um importante papel no tratamento de infecções por nematelmintos e platelmintos, especialmente sob os cestoides. A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes anti-parasitários, sintetizou-se quatro derivados, entre eles o 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20). O objetivo deste estudo foi detectar, por meio de dosagem espectrofotométrica de glicose, e por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a secreção/excreção (S/E) e produção dos ácidos orgânicos que indicam utilização da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico no metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* expostos *in vitro* ao RCB20 e ao sulfóxido de albendazol (ABZSO), nas concentrações de 6,5 e 13 µM, por 24 horas, a 37 °C em 5% de CO₂ e a umidade relativa de 95%. Observou-se um aumento gradativo na secreção/excreção (S/E) de glicose em ambas concentrações de ABZSO e RCB20 testadas. Foi possível observar que os grupos tratados apresentaram maior S/E e produção de citrato, α -cetoglutarato, succinato e fumarato em relação ao grupo controle. Não se observou diferenças na S/E ou produção de piruvato nem oxaloacetato nos grupos tratados. Conclui-se que o RCB20 não demonstrou atividade bioquímica diferente do ABZSO, isto é, a adição de um grupo naftoloxi na posição 5, um grupo trifluorometil na posição 2 e um cloro na posição 6, não altera o mecanismo bioquímico do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol.

Palavras chaves: *Taenia crassiceps*, metabolismo energético, RCB20, sulfóxido de albendazol, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

1. Introdução

O parasito *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800) Rudolphi, 1810 pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae (FREEMAN, 1962; WILLMS & ZURABIAN, 2010). Infecções naturais com sua forma larval, *Cysticercus longicollis* Rudolphi, 1810, têm sido relatadas em roedores silvestres, tais como ratazanas (*Microtus arvalis*), marmotas (*Marmota monax*) e chinchilas (*Chinchilla lanígera*) (WILLMS & ZURABIAN, 2010; BASSO et al., 2014). As formas adultas da *T. crassiceps* habitam, principalmente, o terço médio do intestino dos hospedeiros definitivos (canídeos silvestres e domésticos), os quais eliminam em suas fezes as proglotes grávidas, repletas de ovos, que contaminam o meio ambiente, podendo ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários (roedores silvestres e humanos) (FREEMAN, 1962; MAILLARD et al., 1998).

A cisticercose humana por *T. crassiceps* é incomum, porém tais infecções são potencialmente graves, devido à natureza proliferativa dos cisticercos e sua localização. A presença de grandes populações de roedores e raposas pode contribuir para a distribuição desta infecção (HOBERG et al., 2000 e 2002).

O albendazol é um benzimidazol desenvolvido há mais de 20 anos. Tem um importante papel no tratamento de infecções por nematelmintos e platelmintos, especialmente sob os cestoides. Tem grande eficácia sob *Taenia* sp e *Hymenolepis diminuta*; e protoescoléces de *Echinococcus* são rapidamente eliminados (SCHMIDT, 1998; VENKATESAN, 1998).

Estudos realizados com cisticercos de *T. crassiceps* expostos à albendazol demonstram que, *in vitro*, este fármaco diminui a excreção de lactato pelo parasito, levando a uma preferência por vias aeróbias de produção de energia (VINAUD et al., 2008 e 2009) e *in vivo*, isto é, após o tratamento do hospedeiro, aumentou a produção de oxaloacetato e α -cetoglutarato, assim como induziu à utilização de ácidos graxos como fonte alternativa de energia, observada pelo aumento na produção de β -hidroxibutirato e propionato (FRAGA et al., 2012a e 2012b).

Derivados de benzimidazóis, tais como albendazol e mebendazol são amplamente utilizados no tratamento de diversas helmintíases. A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes

anti-parasitários, foram desenvolvidos quatro derivados. Um desses derivados, o 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20) apresentou um perfil antiparasitário semelhante ao albendazol (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção e a secreção/excreção (S/E) de ácidos orgânicos da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico do metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* expostos *in vitro* a diferentes concentrações de RCB20.

2. Metodologia

2.1-Manutenção do ciclo biológico de *T. crassiceps*

A manutenção do ciclo biológico de *T. crassiceps* foi realizada segundo Fraga et al. (2012a 2012b). Obedeceu-se aos princípios éticos em experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CoEp/UFG) (protocolo número 011/11).

2.2-Cultivo dos cisticercos e exposição aos fármacos

Selecionou-se um animal de manutenção do ciclo biológico, e em câmara de fluxo laminar, fez-se a eutanásia e necropsia. Os cisticercos foram retirados da cavidade peritoneal, lavados em solução fisiológica para a retirada de células e quaisquer outros interferentes (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Em seguida, os cisticercos foram classificados macroscopicamente, de acordo com seu estágio evolutivo: inicial, larval e final (VINAUD et al., 2007; FRAGA et al., 2012a e 2012b)

O cultivo dos cisticercos foi realizado conforme Vinaud et al. (2008 e 2009) e Márquez-Navarro et al. (2013). Utilizou-se 30 cisticercos de cada estágio em 5 mL de meio RPMI suplementado, acrescido de sulfóxido de albendazol (ABZSO) (Sigma-Aldrich®) (6,5 µM ou 13 µM) ou RCB20 (6,5 µM ou 13 µM). Os grupos controles foram compostos por 30 cisticercos de cada estágio evolutivo em 5mL de meio RPMI igualmente suplementado, acrescido ou não de DMSO, sendo o mesmo volume utilizado para a diluição dos fármacos.

Após 24 horas de cultivo, separou-se os cisticercos do meio de cultura. Ambos foram congelados em nitrogênio líquido para estase das reações metabólicas (VINAUD et al., 2008 e 2009).

2.3-Extração e análise de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos secretados/excretados no meio de cultura foram extraídos utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), conforme descrito por Vinaud et al. (2007 e 2008).

Ao passo que os cisticercos, após a estase em nitrogênio líquido, foram descongelados e homogeneizados em 500 µL de tampão tris-HCl a 0,1M, acrescido de inibidores de proteases, com pH 7,6 (RENDÓN et al., 2004 e 2008). O extrato obtido foi centrifugado a 15.652 g (10.000 rpm), por 10 minutos, a 4 °C (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009). Do sobrenadante obtido extraiu-se os ácidos orgânicos utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), conforme descrito por Vinaud et al. (2007, 2008 e 2009) e por Fraga et al. (2012a e 2012b).

As amostras obtidas foram armazenadas a -20 °C para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para as análises cromatográficas, utilizou-se uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex HPX-87H. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico a 5 mM, com vazão de 0,6 mL/min, acoplado a um espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 210 nm. Para isto, empregou-se 50 µL de cada amostra. Os resultados foram analisados pelo programa Star Chromatography Workstation (Agilent®), calibrado para a identificação de ácidos orgânicos da via glicolítica (piruvato e lactato) e do ciclo do ácido cítrico (oxaloacetato, citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato e malato) (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

2.4-Dosagens bioquímicas do meio de cultura

Utilizando-se o aparelho Architect C8000 Plus, por meio de análises espectrofotométricas, fez-se as dosagens das concentrações de glicose secretadas/excretadas pelos cisticercos.

2.5-Análise estatística

Os experimentos foram realizados em quintuplicatas independentes. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Fez-se a estatística descritiva para determinação de média e desvio padrão, e, para avaliar as diferenças entres os grupos analisados, as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição normal, utilizou-se análise da variância. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

As análises permitiram determinar os efeitos bioquímicos do RCB20 no metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps*. Os fármacos foram diluídos em DMSO, o qual não influenciou nas análises realizadas.

Observou-se que, nas concentrações utilizadas, o ABZSO induziu um consumo gradativo de glicose, porém não influenciou em sua captação. Já as dosagens de RCB20 também induziram um consumo gradativo de glicose, porém menor ($p > 0,05$) (Figura 1). Acredita-se que o composto tenha influenciado em sua captação, mecanismo de ação esperado por pertencer à família dos benzimidazóis (VENKATESAN, 1998). Vinaud et al. (2008) também observaram uma influência na captação de glicose, ao expor cisticercos de *T. crassiceps*, *in vitro*, a baixas doses de albendazol. Não foi possível dosar as concentrações de glicose no conteúdo vesicular dos cisticercos devido ao baixo volume final de amostra. Contudo, em estudo *in vivo*, Fraga et al. (2012b) observaram uma maior concentração de glicose nos cisticercos em estágio larval não expostos aos fármacos testados. Apesar da exposição ao fármaco, as dosagens utilizadas não foram suficientes para bloquear totalmente a captação de glicose pelo parasito.

Ao analisar a secreção/excreção (S/E) de ácidos orgânicos, bem como sua produção pelos cisticercos, detectou-se o lactato e o piruvato, que indicam glicólise; o oxaloacetato, o citrato, o α -cetoglutarato, o succinato, o fumarato e o malato que indicam a utilização do ciclo do ácido cítrico (Figuras 1-6). Os resultados aqui encontrados estão de acordo com Vinaud et al. (2008), que em estudo *in vitro*, também detectaram os mesmos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo de cisticercos de *T. crassiceps*.

A S/E de lactato pelo controle de cisticercos em estágio larval foi maior quando comparado com os demais estádios larvais ($p < 0,05$) (Figura 1). Porém, não se observou diferença na produção de lactato pelos cisticercos tratados (Figura 2). Acredita-se que o lactato produzido foi secretado/excretado para o meio de cultura, pois a disponibilidade de oxigênio *in vitro* é maior, não sendo necessária sua utilização para a produção de energia, por meio da gliconeogênese (DEL ARENAL et al., 2005; WILLMS et al., 2005). Diferentemente, Vinaud et al. (2008), em estudo *in vitro*, com cisticercos de *T. crassiceps*, detectaram uma diminuição na S/E deste ácido e Fraga et al. (2012b), em estudo *in vivo*, não detectaram diferenças na produção deste ácido orgânico.

Figura 1. Concentrações médias de produtos de metabolismo secretados/excretados detectados no meio de cultura de cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM e mg/dL

	<i>Glicose (mg/dL)</i>			<i>Piruvato (μM)</i>			<i>Lactato (μM)</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	^c 141,4 $\pm$ 34,37	81,25 $\pm$ 52,36	34,00 $\pm$ 14,79	1,27 $\pm$ 0,31	2,98 $\pm$ 3,54	7,67 $\pm$ 8,02	128,051 $\pm$ 52,64	^c 320,378 $\pm$ 27,38	1722,65 $\pm$ 1751,33
ABZSO 6,5 μM	^c 148,5 $\pm$ 34,48	73,4 $\pm$ 44,98	26,33 $\pm$ 11,5	2,65 $\pm$ 3,69	3,71 $\pm$ 3,88	4,96 $\pm$ 3,64	107,64 $\pm$ 19,56	240,70 $\pm$ 6,01	2053,37 $\pm$ 1920,73
ABZSO 13 μM	^c 147,00 $\pm$ 31,45	49,33 $\pm$ 24,76	34,66 $\pm$ 5,13	0,76 $\pm$ 0,30	12,10 $\pm$ 24,85	3,53 $\pm$ 3,06	102,37 $\pm$ 19,66	^c 281,59 $\pm$ 17,88	ND
RCB20 6,5μM	147,8 $\pm$ 26,79	93,4 $\pm$ 55,28	69,75 $\pm$ 49,41	1,60 $\pm$ 2,03	6,96 $\pm$ 7,00	7,75 $\pm$ 8,10	123,26 $\pm$ 52,77	ND	ND
RCB20 13μM	153,2 $\pm$ 27,77	110,2 $\pm$ 64,98	94,00 $\pm$ 45,77	2,31 $\pm$ 3,61	10,33 $\pm$ 13,49	10,02 $\pm$ 11,56	107,88 $\pm$ 28,68	^c 210,26 $\pm$ 39,40	ND

^c: $p < 0,05$ quando comparado com os demais estádios do mesmo grupo de tratamento ou grupo controle

ND: Não detectado

Figura 2. Concentrações médias de produtos da glicólise detectados em cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM .

	<i>Piruvato</i>			<i>Lactato</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	10,05 $\pm$ 13,63	6,53 $\pm$ 9,05	60,94 $\pm$ 96,25	315,53 $\pm$ 124,26	1479,51 $\pm$ 562,05	2427,67 $\pm$ 2269,51
ABZSO 6,5 μM	6,37 $\pm$ 5,64	107,64 $\pm$ 137,63	ND	242,44 $\pm$ 32,61	550,60 $\pm$ 458,49	ND
ABZSO 13 μM	2,93 $\pm$ 1,51	6,44 $\pm$ 4,78	8,75 $\pm$ 0,83	291,19 $\pm$ 132,71	1172,30 $\pm$ 49,64	1162,78 $\pm$ 271,15
RCB20 6,5μM	14,86 $\pm$ 22,17	7,84 $\pm$ 11,82	ND	280,11 $\pm$ 48,16	ND	570,32 $\pm$ 780,75
RCB20 13μM	ND	107,52 $\pm$ 233,20	147,44 $\pm$ 261,03	967,88 $\pm$ 774,61	487,58 $\pm$ 287,57	1416,75 $\pm$ 76,47

ND: Não detectado

Não foram detectadas alterações na produção e na S/E de piruvato nos grupos analisados (Figuras 1 e 2), indicando que, nas concentrações testadas, os fármacos não foram capazes de alterar as vias de formação deste ácido, podendo, assim, ser consumido para a formação de malato mitocondrial e citoplasmático, acetil-CoA e alanina, como descrito por Corbin et al. (1998), que detectaram as vias de degradação da glicose e do ciclo do ácido cítrico em cisticercos de *T. crassiceps*. Diferentemente, Fraga et al. (2012b) não detectaram a produção deste ácido, isto ocorreu, provavelmente, porque *in vitro*, a disponibilidade de oxigênio é maior do que a observada *in vivo*, visto que a atividade do ciclo do ácido cítrico é diretamente proporcional à quantidade de oxigênio no meio (LENHIGNER et al., 2007).

Ao analisar as concentrações de oxaloacetato, não se observou diferença tanto em sua S/E (Figura 3), quanto em sua produção pelos cisticercos (Figura 4), quando se compararam os grupos tratados com o grupo controle. Entretanto, Fraga et al. (2012b) observaram que sua produção foi maior pelo estágio larval, seguido do inicial e final, em estudo *in vivo*, após tratamento do hospedeiro com o albendazol. Isso ocorreu, pois, nas concentrações utilizadas, os compostos não influenciaram a atividade das enzimas malato desidrogenase citosólica e malato desidrogenase mitocondrial, proporcionando o seu consumo para a produção de metabólitos como o malato (CORBIN et al., 1998; LENHIGNER et al., 2007).

Observou-se um aumento na S/E de citrato pelos cisticercos em estágio larval tratados com ambas as concentrações de RCB20, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 5). Por outro lado, observou-se uma maior produção de citrato pelos estádios larvais tratados com ABZSO a 13 μM e RCB20 a 6,5 μM e pelos estádios finais tratados com RCB20 a 6,5 e 13 μM ($p < 0,05$) (Figura 6). Diante da exigência metabólica destes estádios evolutivos, observa-se maior degradação de glicose e maior atividade de vias metabólicas como a via do ácido cítrico, o que leva a maior produção de citrato (WILLMS et al., 2005). Vinaud et al. (2008) não detectaram diferenças estatísticas na S/E de citrato entre os grupos controle e os grupos tratados com o albendazol, também *in vitro*. Entretanto, a dosagem utilizada por estes autores foi menor que as usadas no presente estudo, provavelmente não afetando vias metabólicas aeróbias. Provavelmente, houve este incremento, nesta via de produção de energia, devido a um dos mecanismos de ação do fármaco: o de alterar a incorporação de glicose

pelos parasitos (CIOLI et al., 1995; HORTON, 2000; CIOLI & PICA-MOTTOCCIA, 2003).

Figura 3. Concentrações médias de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μ M.

	<i>Oxaloacetato</i>			<i>Malato</i>			<i>Fumarato</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	1,84 $\pm$ 1,57	7,72 $\pm$ 10,09	8,45 $\pm$ 8,65	16,97 $\pm$ 11,28	68,32 $\pm$ 57,59	79,72 $\pm$ 62,32	5,43 $\pm$ 1,73	25,19 $\pm$ 19,03	30,62 $\pm$ 32,74
ABZSO 6,5 μM	4,11 $\pm$ 2,27	11,72 $\pm$ 13,0	15,03 $\pm$ 13,17	26,77 $\pm$ 7,20	64,22 $\pm$ 55,02	107,69 $\pm$ 59,92	4,52 $\pm$ 3,32	25,20 $\pm$ 13,60	41,55 $\pm$ 43,09
ABZSO 13 μM	2,69 $\pm$ 0,89	34,76 $\pm$ 63,09	10,98 $\pm$ 7,91	29,04 $\pm$ 15,00	114,65 $\pm$ 60,84	^c 121,67 $\pm$ 11,89	5,58 $\pm$ 2,75	38,12 $\pm$ 21,34	^c 43,33 $\pm$ 38,68
RCB20 6,5μM	4,79 $\pm$ 3,79	18,49 $\pm$ 17,65	23,08 $\pm$ 20,84	46,59 $\pm$ 24,89	92,34 $\pm$ 41,02	79,58 $\pm$ 30,55	6,06 $\pm$ 3,48	24,44 $\pm$ 21,00	36,28 $\pm$ 40,06
RCB20 13μM	6,4 $\pm$ 8,68	17,69 $\pm$ 12,72	36,85 $\pm$ 35,30	39,30 $\pm$ 13,29	100,94 $\pm$ 113,84	94,65 $\pm$ 15,72	5,79 $\pm$ 4,11	23,91 $\pm$ 15,75	31,40 $\pm$ 29,62

^c: p<0,05 quando comparado com os demais estádios do mesmo grupo de tratamento ou grupo controle

Figura 4. Concentrações médias de ácidos orgânicos detectados no fluido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM .

	<i>Oxaloacetato</i>			<i>Malato</i>			<i>Fumarato</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	4,34 $\pm$ 0,43	15,11 $\pm$ 9,53	11,20 $\pm$ 8,35	79,88 $\pm$ 41,01	1214,86 $\pm$ 550,45	3844,12 $\pm$ 2929,66	23,38 $\pm$ 4,2	287,49 $\pm$ 130,70	785,71 $\pm$ 456,87
ABZSO 6,5 μM	4,59 $\pm$ 0,19	20,92 $\pm$ 11,28	32,29 $\pm$ 39,33	98,56 $\pm$ 37,01	1433,47 $\pm$ 849,26	^c 4801,41 $\pm$ 1124,24	25,36 $\pm$ 13,62	404,25 $\pm$ 231,61	846,25 $\pm$ 484,19
ABZSO 13 μM	23,51 $\pm$ 31,49	13,04 $\pm$ 12,49	12,72 $\pm$ 9,45	84,82 $\pm$ 13,77	1182,82 $\pm$ 706,17	3713,01 $\pm$ 1299,50	19,98 $\pm$ 2,92	287,97 $\pm$ 144,95	719,30 $\pm$ 224,15
RCB20 6,5μM	12,56 $\pm$ 14,06	31,06 $\pm$ 11,66	49,36 $\pm$ 39,97	122,18 $\pm$ 56,98	1427,17 $\pm$ 1301,54	3244,67 $\pm$ 1151,67	36,56 $\pm$ 25,49	514,76 $\pm$ 730,28	650,16 $\pm$ 203,90
RCB20 13μM	15,80 $\pm$ 10,98	44,41 $\pm$ 34,11	65,71 $\pm$ 45,67	214,58 $\pm$ 189,64	1730,09 $\pm$ 1132,00	24,78 $\pm$ 847,69	67,29 $\pm$ 70,25	455,80 $\pm$ 388,94	585,23 $\pm$ 231,89

^c: $p < 0,05$ quando comparado com os demais estádios do mesmo grupo de tratamento ou grupo controle

Figura 5. Concentrações médias de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM .

	<i>Citrato</i>			<i>α-cetogluturato</i>			<i>Succinato</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	13,98 $\pm$ 9,9	33,48 $\pm$ 16,05	27,43 $\pm$ 10,34	1,73 $\pm$ 1,32	4,69 $\pm$ 1,91	7,18 $\pm$ 5,05	101,48 $\pm$ 58,31	815,44 $\pm$ 622,57	^c 3011,60 $\pm$ 1541,21
ABZSO 6,5 μM	24,93 $\pm$ 7,96	39,52 $\pm$ 5,81	28,33 $\pm$ 6,86	2,50 $\pm$ 3,22	1,86 $\pm$ 1,38	4,33 $\pm$ 5,30	59,94 $\pm$ 14,94	1412,92 $\pm$ 782,37	^c 3563,84 $\pm$ 439,49
ABZSO 13 μM	21,05 $\pm$ 5,27	86,13 $\pm$ 117,65	20,81 $\pm$ 9,03	0,70 $\pm$ 0,33	5,06 $\pm$ 5,78	2,37 $\pm$ 1,00	154,30 $\pm$ 163,93	3540,27 $\pm$ 5971,32	^c 2908,54 $\pm$ 524,83
RCB20 6,5μM	38,23 $\pm$ 28,55	^a 151,64 $\pm$ 121,49	136,23 $\pm$ 98,99	1,90 $\pm$ 2,06	7,71 $\pm$ 8,88	11,32 $\pm$ 10,55	109,09 $\pm$ 58,16	1468,35 $\pm$ 972,38	^c 2430,29 $\pm$ 1694,16
RCB20 13μM	28,55 $\pm$ 9,57	^a 208,10 $\pm$ 196,38	250,04 $\pm$ 203,47	3,1 $\pm$ 4,76	ND	12,84 $\pm$ 13,51	140,79 $\pm$ 53,39	1569,11 $\pm$ 1047,87	^c 3097,77 $\pm$ 1194,26

^a: p<0,05 quando comparado à mesma fase evolutiva do grupo controle

^c: p<0,05 quando comparado com os demais estádios do mesmo grupo de tratamento ou grupo controle

Figura 6. Concentrações médias de ácidos orgânicos detectados no fluido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* nas fases inicial, larval e final, tratados com diferentes concentrações de sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μ M.

	<i>Citrato</i>			<i>α-cetoglutarato</i>			<i>Succinato</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Larval</i>	<i>Final</i>
Controle	46,57 $\pm$ 57,05	100,71 $\pm$ 136,15	44,85 $\pm$ 44,91	29,65 $\pm$ 40,29	15,62 $\pm$ 10,72	35,02 $\pm$ 16,50	437,14 $\pm$ 260,88	1641,31 $\pm$ 1443,31	2021,51 $\pm$ 2487,50
ABZSO 6,5 μM	17,25 $\pm$ 13,19	48,87 $\pm$ 50,18	46,30 $\pm$ 44,90	ND	4,25 $\pm$ 1,44	7,31 $\pm$ 5,65	237,33 $\pm$ 191,98	3072,24 $\pm$ 3006,93	3179,69 $\pm$ 4248,65
ABZSO 13 μM	18,08 $\pm$ 12,68	^b 88,73 $\pm$ 27,78	37,08 $\pm$ 26,98	2,03 $\pm$ 0,35	4,99 $\pm$ 0,33	73,32 $\pm$ 5,77	273,01 $\pm$ 233,94	3176,30 $\pm$ 688,65	1926,40 $\pm$ 2431,73
RCB20 6,5μM	86,26 $\pm$ 123,91	^b 383,68 $\pm$ 175,07	^b 351,75 $\pm$ 218,45	ND	^b 29,64 $\pm$ 31,09	^b 31,17 $\pm$ 4,25	565,63 $\pm$ 890,14	3286,17 $\pm$ 3016,41	4215,08 $\pm$ 2604,59
RCB20 13μM	ND	274,21 $\pm$ 249,84	^b 357,66 $\pm$ 260,12	ND	26,09 $\pm$ 16,02	22,13 $\pm$ 15,26	873,25 $\pm$ 671,34	3508,10 $\pm$ 2312,35	2981,02 $\pm$ 1900,13

^b: p<0,05 quando comparado com à mesma fase evolutiva da outra concentração testada

ND: Não detectado

A produção de α -cetoglutarato foi maior pelo estágio larval tratado com RCB20 a 6,5 μM quando comparado ao mesmo estágio, quando tratado com ABZSO a 6,5 μM ($p < 0,05$) (Figura 6). Porém, não se observou diferença na S/E de α -cetoglutarato pelos cisticercos (Figura 5). Fraga et al. (2012b) também detectaram um aumento na produção de α -cetoglutarato pelos estádios larvais tratados com albendazol e praziquantel. De tal modo, o RCB20 e o ABZSO influenciaram na captação de glicose pelos cisticercos, acredita-se assim, que o α -cetoglutarato detectado pode ter sido produzido a partir do glutamato, devido à degradação de proteínas, de forma semelhante à que ocorre em mamíferos, como uma via alternativa de produção de energia (LENHINGER et al., 2007; FRAGA et al., 2012b).

A S/E de succinato foi maior pelos estádios finais de todos os grupos tratados ($p < 0,05$) (Figura 5). Porém não se observou diferença na produção de succinato pelos cisticercos (Figura 6). Observou-se, também, um aumento gradativo na S/E de fumarato pelos cisticercos tratados com ABZSO a 13 μM ($p < 0,05$) (Figura 3). Entretanto, os fármacos utilizados não influenciaram na produção de fumarato (Figura 4). Observou-se, ainda, um aumento gradativo na S/E de malato pelos cisticercos tratados com ABZSO a 13 μM ($p < 0,05$) (Figura 3), assim como um aumento gradativo na produção de malato pelos cisticercos tratados com ABZSO a 6,5 μM ($p < 0,05$) (Figura 4). Com o objetivo de aumentar a produção de energia, devido à influência dos fármacos na captação de glicose, possivelmente ocorreu um incremento nas vias das enzimas fumarase e fumarato redutase, todas reversíveis, aumentando assim, a detecção destes ácidos orgânicos. Além disso, o aumento na produção de succinato pode ter sido necessária para uma maior produção de energia a partir da cadeia transportadora de elétrons (CORBIN et al., 1998; DEL ARENAL et al., 2005; WILLMS et al., 2005; LENHIGNER et al., 2007).

Ao se correlacionar a produção e a S/E, verificou-se que a produção dos metabólitos foi maior, cerca de 1,5 a 3 vezes, do que sua S/E. Provavelmente isso ocorreu, porque ambos os fármacos têm como alvo alterar as proteínas formadoras dos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas cilíndricas encontradas em células eucariotas, que estão envolvidas em muitos processos celulares, tais como formação de vesículas intracelulares para a S/E de metabólitos (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Sabe-se que o alvo do albendazol é a β -tubulina isovariante 2 (CHAMBERS et

al., 2010) e segundo Márquez-Navarro et al. (2013), o RCB20 pode provocar modificações na expressão de α -tubulina tirosinada.

Conclui-se que os cisticercos de *T. crassiceps* expostos, *in vitro*, ao ABZSO e ao RCB20, apresentaram adaptações metabólicas diferentes do que foi observado, anteriormente, *in vivo* e *in vitro*. O RCB20, apesar de mais solúvel e estável que o ABZSO, não demonstrou alterações bioquímicas na S/E de ácidos orgânicos da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico de cisticercos de *T. crassiceps*, isto é, a adição de um grupo naftoloxi na posição 5, um grupo trifluorometil na posição 2 e um cloro na posição 6, não potencializa o mecanismo bioquímico do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol.

4. Bibliografia

BASSO, W.; RÜTTER, M.; DEPLAZES, P.; GRIMM, F. Generalized *Taenia crassiceps* cysticercosis in a chinchila (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Parasitology*, Holanda, n. 199, p.116-120, 2014.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., Praziquantel. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 90, p. S3-S9, 2003.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future?. *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Inglaterra, v 1, n. 68, p. 35-85, 1995.

CORBIN, I.; SIMCOFF, R.; NOVAK, M.; BLACKBURN, B. J. Metabolism of [3-¹³C]-pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, Alemanha, n.84, p. 516-518, 1998.

DEL ARENAL, I. P.; RUBIO, M. E.; RAMIREZ, J.; RENDÓN, J. L.; ESCAMILLA, J. E. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *Parasitology International*, Holanda, n. 54, p. 185-193, 2005.

FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 131, p. 111-115, 2012a.

- FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 130, p. 146-151, 2012b.
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*, Canadá, n. 40, p. 969-990, 1962.
- HOBERG, E. P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection*, França, n. 4, p. 859-866, 2002.
- HOBERG, E. P.; JONES, A.; RAUSCH, R. L.; EMON, K. S.; GARDNER, S. L. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda: Taeniidae). *The Journal of Parasitology*, Estados Unidos, n. 86, p. 89-98, 2000.
- HORTON, J. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, Inglaterra, n. 121, p. S113-S132, 2000.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Quarta edição. São Paulo: Sarvier, 2007. 1202 p.
- MAILLARD, H.; MARIONNEAU, J.; PROPHETTE, B.; BOYER, E.; CELERIER, P. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. *AIDS*, Inglaterra, n. 12, p. 1551-1552. 1998.
- MÁRQUEZ-NAVARRO, A.; PÉREZ-REYES, A.; ZEPEDA-RODRIGUES, A.; REYNOSO-DUCOING, O.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; CASTILLO, R.; YÉPEZ-MULI, A. L.; AMBROSIO, J. R. RCB20, an experimental benzimidazole derivative, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 112, p. 2215-2226, 2013.
- RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; MENDONZA-HERNÁNDEZ, G.; PARDO, J. P. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from larval *Taenia crassiceps* (cysticerci): purification and properties. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 102, p. 1351-1357, 2008.
- RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; URIBE, A.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps*

metacestode (cysticerci). *Molecular and Biochemical Parasitology*, Holanda, n. 133, p. 61–69, 2004.

SCHMIDT, J. Effects of benzimidazole anthelmintics as microtubule-active drugs on the synthesis and transport of surface glycoconjugates in *Hymenolepis microstoma*, *Echinostoma caproni* and *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 84, p. 362-368, 1998.

VENKATESAN, V. Albendazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Inglaterra, n. 4, p. 145-147, 1998.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 120, p. 221-226, 2008.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 122, v. 2, p. 208-211, 2009.

VINAUD, M. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps* organic acids detect in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 116, p. 335-339, 2007.

WILLMS, K.; PRESAS, A. M. F.; JIMÉNEZ, J. A.; LANDA, A.; ZURABIÁN, R.; UGARTE, M. E. J.; ROBERT, L., Taeniid tapeworm responses to *in vitro* glucose. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 96, p. 296-301, 2005.

WILLMS, K.; ZURABIAN, R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*, Inglaterra, v. 3, n. 137, p. 335-346, 2010.

Artigo 2 – Vias alternativas de produção de energia de cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) expostos ao derivado benzimidazólico RCB20

Resumo

Em algumas regiões do mundo, os parasitos da família Taeniidae continuam sendo um grande problema de saúde pública. A cisticercose por *T. crassiceps* é uma doença rara, porém constitui um risco zoonótico, especialmente a indivíduos imunocomprometidos, de acordo com relatos de casos provenientes da França, Alemanha e Inglaterra. O albendazol tem um importante papel no tratamento de infecções por nematelmintos e platelmintos, especialmente sob os cestóides. A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, sintetizaram-se quatro derivados, entre eles o 6-cloro-5-(1-naftiloxi) -2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol (RCB20). Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar as vias alternativas de produção de energia por cisticercos de *T. crassiceps*, após o tratamento *in vitro* com o RCB20, por meio da dosagem espectrofotométrica de ureia, creatinina e proteínas totais, e por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a secreção/excreção (S/E) e produção os ácidos orgânicos indicadores de oxidação de ácidos graxos e degradação de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* expostos *in vitro* ao RCB20 e ao sulfóxido de albendazol (ABZSO), a 6,5 e 13 μM , por 24 horas, a 37 °C em 5% de CO_2 e à umidade relativa de 95%. Observou-se um aumento gradativo na produção de acetato pelos cisticercos tratados com RCB20 a 6,5 μM . Analisando a produção de acetoacetato, observou-se que este ácido foi pouco produzido pelos cisticercos, além disso, não foi possível detectá-lo no meio de cultura. Enquanto isso, não se observou diferença na produção e S/E de β -hidroxibutirato e propionato pelos cisticercos. Ainda que não se tenha observado diferença na S/E de creatinina e proteínas totais, observou-se um aumento gradativo na S/E de fumarato e ureia pelos cisticercos tratados com ABZSO. Conclui-se assim, que apesar de não promoverem o bloqueio total na captação de glicose, os ABZSO e o RCB20 influenciaram em sua captação, induzindo o parasito a utilizar vias alternativas de produção de energia, com as vias de oxidação de ácidos graxos e de degradação de proteínas. Além disso, apesar de mais solúvel e estável, o RCB20 não demonstrou atividade bioquímica diferente do ABZSO.

Palavras chaves: *Taenia crassiceps*, β -oxidação, metabolismo de proteínas, RCB20, sulfóxido de albendazol, CLAE

1. Introdução

Em algumas regiões do mundo, os parasitos da família Taeniidae continuam sendo um grande problema de saúde pública, o que os tornam objetos de estudos epidemiológicos (HOBERG et al., 2000). O parasito *Taenia crassiceps* tem como hospedeiros definitivos canídeos silvestres, podendo infectar cães domésticos e, como hospedeiros intermediários, roedores, como ratazanas e marmotas (SAEED et al., 2006; BAGRADE et al., 2009; STIEN et al., 2010; WILLMS & ZURABIAN, 2010). A cisticercose por *T. crassiceps* é uma doença rara, porém constitui um risco zoonótico, especialmente a indivíduos imunocomprometidos (WÜNSCHMANN et al., 2003). De acordo com relatos de casos provenientes da França, Alemanha e Inglaterra, foram detectados cisticercos em musculatura esquelética, sistema nervoso central, região intra-ocular e subcutânea. O tratamento dos pacientes foi bem-sucedido e foram utilizados o albendazol e o praziquantel (SHEA et al., 1973; AROCKER-METTINGER et al., 1992; KLINKER et al., 1992; CHERMETTE et al., 1995; FRANÇOIS et al., 1998; MAILLARD et al., 1998; HELDWEIN et al., 2006).

O albendazol é um fármaco do grupo dos benzimidazóis; e demonstrou-se que sua forma ativa, o sulfóxido de albendazol, é eficaz *in vivo* e *in vitro* contra formas adultas, ovos e larvas de nematoides e cestoides (HORTON, 2000; MARQUES et al., 2002). Sua forma ativa se liga à β -tubulina dos parasitos, inibindo a polimerização dos microtúbulos. Como consequência, modificam o tegumento dos parasitos, alterando o processo de transporte de substâncias, como a glicose (SCHMIDT, 1998; VENKATESAN, 1998; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Além de induzir múltiplos efeitos na divisão celular e na absorção de nutrientes, afeta ainda a síntese e secreção de glicoconjugados, pois a integridade e organização dos retículos endoplasmáticos e do complexo de Golgi também requerem microtúbulos (SCHMIDT, 1998).

A fim de identificar o potencial do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol, para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, sintetizaram-se quatro derivados, sendo um deles o RCB20, os quais foram testados, *in vitro*, para o tratamento de protozoários e helmintos (NAVARRETE-VÁZQUEZ et al., 2001, 2003 e 2006; HERNÁNDEZ-LUIS et al., 2010).

Márquez-Navarro et al. (2013), em estudo *in vitro* com cisticercos de *T. crassiceps*, observaram que o tratamento com o RCB20 alterou os cílios das células flamas, o que provavelmente levou a morte dos cisticercos. Além disso, sugerem que o fármaco tem modo de ação diferente do ABZSO, pois parece induzir alterações em tubulinas acetiladas ou tirosinadas por interação direta com proteínas, promovendo, assim, o rompimento dos microtúbulos.

Apesar de comprovada a eficiência do RCB20 como antiparasitário contra *T. crassiceps*, ainda não foi estudado seu impacto no metabolismo de cisticercos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as vias alternativas de produção de energia por cisticercos de *T. crassiceps*, após o tratamento *in vitro* com o RCB20.

2. Metodologia

2.1-Manutenção do ciclo biológico da *T. crassiceps*

A manutenção do ciclo biológico de *T. crassiceps* foi realizada segundo Fraga et al. (2012a). Obedeceu-se aos princípios éticos em experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CoEp/UFG) (protocolo número 011/11).

2.2-Cultivo dos cisticercos e exposição aos fármacos

Selecionou-se um animal de manutenção do ciclo biológico e, em câmara de fluxo laminar, fez-se a eutanásia e a necropsia. Os cisticercos foram retirados da cavidade peritoneal, lavados em solução fisiológica para a retirada de células e quaisquer outros interferentes (MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2013). Em seguida, os cisticercos foram classificados macroscopicamente, de acordo com seu estágio evolutivo: inicial, larval e final (VINAUD et al., 2007; FRAGA et al., 2012a e 2012b)

O cultivo dos cisticercos foi realizado conforme Vinaud et al., (2008 e 2009) e Márquez-Navarro et al. (2013). Utilizou-se 30 cisticercos de cada estágio em 5 mL de meio RPMI suplementado, acrescido de sulfóxido de albendazol (ABZSO) (Sigma-Aldrich®) (6,5 μ M e 13 μ M) ou RCB20 (6,5 μ M e 13 μ M). Os grupos controles foram composto por 30 cisticercos de cada estágio evolutivo cultivados em 5mL de meio RPMI igualmente suplementado, porém acrescido ou não de DMSO.

Após 24 horas de cultivo, separou-se os cisticercos do meio de cultura. Ambos foram congelados em nitrogênio líquido para estase das reações metabólicas (VINAUD et al., 2008 e 2009).

2.3-Dosagens bioquímicas do meio de cultura

Utilizando-se o aparelho Architect C8000 Plus, por meio de análises espectrofotométricas, fez-se as dosagens das concentrações de ureia, creatinina e proteínas totais secretadas/excretadas.

2.4-Extração de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos secretados/excretados no meio de cultura foram extraídos utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), conforme descrito por Vinaud et al. (2007, 2008 e 2009) e por Fraga et al. (2012a e 2012b).

Após a estase em nitrogênio líquido, os cisticercos foram descongelados e homogeneizados em 500 µL de tampão tris-HCl a 0,1 M, com pH 7,6, acrescido de inibidores de proteases (RENDÓN et al., 2004 e 2008). O extrato obtido foi centrifugado a 15.652 g (10.000 rpm), por 10 minutos, a 4 °C (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009). Do sobrenadante obtido extraiu-se os ácidos orgânicos, utilizando-se uma coluna de troca iônica (Bond Elut® Agilent®), conforme descrito por Vinaud et al. (2007, 2008 e 2009) e por Fraga et al. (2012a e 2012b).

As amostras obtidas foram congeladas para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.5-Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para as análises cromatográficas, utilizou-se uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex HPX-87H. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico a 5mM, com vazão de 0,6 mL/min, acoplado a um espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 210 nm. Para isto, empregou-se 50 µL de cada amostra (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

Os resultados foram analisados por meio do programa Star Chromatography Workstation (Agilent®), calibrado para a identificação de ácidos orgânicos do metabolismo de ácidos graxos (acetato, acetoacetato, β-hidroxibutirato, propionato) (VINAUD et al., 2007, 2008 e 2009; FRAGA et al., 2012a e 2012b).

2.6-Análise estatística

Realizaram-se 5 repetições do experimento. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Fez-se a estatística descritiva para determinação de média e desvio padrão, e, para avaliar as diferenças entre os grupos analisados, as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição normal, utilizou-se análise da variância. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (FRAGA et al., 2012a e 2012b).

3. Resultados e Discussão

Ao analisar a detecção de ácidos orgânicos secretados/excretados e produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* tratados *in vitro* com ABZSO e RCB20 a 6,5 μM e 13 μM , foi possível detectar, nas diferentes formas evolutivas do parasito, os ácidos orgânicos que indicam oxidação de ácidos graxos: acetato, acetoacetato, β -hidroxibutirato, propionato. Além disso, detectou-se metabólitos provenientes do metabolismo de proteínas, tais como: fumarato, ureia e creatinina, bem como dosou-se a concentração de proteínas presentes no meio de cultura (Tabelas 1 e 2). Os fármacos foram diluídos em DMSO, o qual não influenciou nas análises realizadas.

Observou-se um aumento gradativo na produção de acetato pelos cisticercos tratados com RCB20 a 6,5 μM ($p < 0,05$). Porém, não se observou diferença na sua secreção/excreção (S/E). Analisando a produção de acetoacetato, verificou-se que este ácido foi pouco produzido pelos cisticercos, além disso, não foi possível detectá-lo no meio de cultura. Enquanto isso, não se observou diferença na produção e S/E de β -hidroxibutirato pelos cisticercos.

Tabela 1: Concentrações médias de produtos do metabolismo secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM e mg/dL

		MEIO DE CULTURA							
		Acetato (μM)	Acetoacetato (μM)	β -hidroxibutirato (μM)	Propionato (μM)	Fumarato (μM)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteínas (g/dL)
Controle	<i>Inicial</i>	37,13 $\pm$ 30,06	ND	114,60 $\pm$ 47,11	44,56 $\pm$ 40,75	5,43 $\pm$ 1,73	7,66 $\pm$ 233	0,23 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,14
	<i>Larval</i>	212,31 $\pm$ 23,27	ND	450,42 $\pm$ 489,10	21,07 $\pm$ 1,94	25,19 $\pm$ 19,03	10,50 $\pm$ 2,25	0,25 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,08
	<i>Final</i>	781,61 $\pm$ 333,81	ND	425,68 $\pm$ 567,72	25,07 $\pm$ 9,54	30,62 $\pm$ 32,74	11,00 $\pm$ 3,5	0,30 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,10
ABZSO 6,5 μM	<i>Inicial</i>	100,79 $\pm$ 108,04	ND	63,49 $\pm$ 50,64	71,32 $\pm$ 68,20	4,52 $\pm$ 3,32	8,50 $\pm$ 2,81	0,26 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,12
	<i>Larval</i>	258,00 $\pm$ 130,87	ND	307,35 $\pm$ 332,18	32,21 $\pm$ 16,47	25,20 $\pm$ 13,60	11,50 $\pm$ 2,58	0,25 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,07
	<i>Final</i>	649,07 $\pm$ 334,33	ND	570,30 $\pm$ 380,31	20,76 $\pm$ 18,66	^c 41,55 $\pm$ 43,09	^c 12,66 $\pm$ 2,65	0,25 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,08
ABZSO 13 μM	<i>Inicial</i>	28,25 $\pm$ 8,51	ND	118,48 $\pm$ 128,09	61,32 $\pm$ 70,42	5,58 $\pm$ 2,75	7,83 $\pm$ 2,48	0,25 $\pm$ 0,08	0,60 $\pm$ 0,14
	<i>Larval</i>	542,80 $\pm$ 846,76	ND	433,09 $\pm$ 532,38	221,77 $\pm$ 312,18	38,12 $\pm$ 21,34	10,50 $\pm$ 3,20	0,20 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,11
	<i>Final</i>	473,47 $\pm$ 59,15	ND	ND	53,91 $\pm$ 4,73	^c 43,33 $\pm$ 38,68	^c 10,83 $\pm$ 1,83	0,25 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,05
RCB20 6,5μM	<i>Inicial</i>	51,00 $\pm$ 44,87	ND	98,62 $\pm$ 70,26	86,60 $\pm$ 74,20	6,06 $\pm$ 3,48	7,83 $\pm$ 2,22	0,23 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,10
	<i>Larval</i>	225,64 $\pm$ 160,20	ND	419,10 $\pm$ 481,60	59,09 $\pm$ 30,34	24,44 $\pm$ 21,00	10,83 $\pm$ 2,71	0,25 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,10
	<i>Final</i>	^c 512,32 $\pm$ 118,78	ND	385,82 $\pm$ 423,83	39,63 $\pm$ 28,96	36,28 $\pm$ 40,06	10,66 $\pm$ 2,50	0,26 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,08
RCB20 13μM	<i>Inicial</i>	665,45 $\pm$ 1199,53	ND	122,21 $\pm$ 84,44	74,81 $\pm$ 49,04	5,79 $\pm$ 4,11	8,00 $\pm$ 2,19	0,21 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,10
	<i>Larval</i>	237,08 $\pm$ 153,44	ND	467,70 $\pm$ 626,33	43,63 $\pm$ 23,31	23,91 $\pm$ 15,75	10,50 $\pm$ 2,07	0,26 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,10
	<i>Final</i>	624,24 $\pm$ 438,84	ND	640,90 $\pm$ 328,33	33,18 $\pm$ 0,14	31,40 $\pm$ 29,62	10,00 $\pm$ 1,09	0,23 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,06

^c: $p < 0,05$ quando comparado com os demais estádios do mesmo grupo de tratamento ou grupo controle

ND: Não detectado

Tabela 2: Concentrações médias de produtos do metabolismo produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps*, nas fases inicial, larval e final, após tratamento com sulfóxido de albendazol (ABZSO) e 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol (RCB20). Resultados em média $\pm$ desvio padrão em μM e mg/dL

<i>FLUIDO VESICULAR DE CISTICERCOS</i>						
		Acetato	Acetoacetato	β -hidroxibutirato	Propionato	Fumarato
Controle	<i>Inicial</i>	3386,45 $\pm$ 3667,20	ND	915,06 $\pm$ 699,64	78,79 $\pm$ 42,16	23,38 $\pm$ 4,2
	<i>Larval</i>	ND	ND	2307,83 $\pm$ 1972,94	ND	287,49 $\pm$ 130,70
	<i>Final</i>	ND	ND	409,71 $\pm$ 118,95	ND	785,71 $\pm$ 456,87
ABZSO 6,5 μM	<i>Inicial</i>	ND	48,47 $\pm$ 36,92	ND	104,99 $\pm$ 39,67	25,36 $\pm$ 13,62
	<i>Larval</i>	ND	131,82 $\pm$ 91,04	1386,57 $\pm$ 1889,58	ND	404,25 $\pm$ 231,61
	<i>Final</i>	ND	653,03 $\pm$ 175,44	630,54 $\pm$ 842,21	ND	846,25 $\pm$ 484,19
ABZSO 13 μM	<i>Inicial</i>	5530,98 $\pm$ 4821,65	ND	ND	488,62 $\pm$ 711,90	19,98 $\pm$ 2,92
	<i>Larval</i>	ND	ND	1972,34 $\pm$ 3127,80	ND	287,97 $\pm$ 144,95
	<i>Final</i>	ND	240,96 $\pm$ 288,44	ND	ND	719,30 $\pm$ 224,15
RCB20 6,5μM	<i>Inicial</i>	75,89 $\pm$ 1,65	52,04 $\pm$ 34,51	823,45 $\pm$ 1090,97	59,26 $\pm$ 14,83	36,56 $\pm$ 25,49
	<i>Larval</i>	ND	88,49 $\pm$ 17,68	2703,71 $\pm$ 1690,38	ND	514,76 $\pm$ 730,28
	<i>Final</i>	ND	319,53 $\pm$ 265,12	ND	ND	650,16 $\pm$ 203,90
RCB20 13μM	<i>Inicial</i>	ND	30,91 $\pm$ 10,90	1015,76 $\pm$ 943,68	791,24 $\pm$ 947,01	67,29 $\pm$ 70,25
	<i>Larval</i>	ND	ND	2787,33 $\pm$ 2416,80	ND	455,80 $\pm$ 388,94
	<i>Final</i>	ND	ND	270,05 $\pm$ 9,73	ND	585,23 $\pm$ 231,89

ND: Não detectado

Em decorrência da influência do ABZSO e do RCB20 na captação de glicose, acredita-se que, assim como os mamíferos, o parasito tenha utilizado vias alternativas de produção de energia, como a degradação de ácidos graxos. Com isso, a não detecção de acetoacetato pode ser em decorrência de sua degradação em corpos cetônicos como o β -hidroxibutirato e o acetato. Além disso, o β -hidroxibutirato produzido, em uma reação inversa pode ter sido utilizado tanto para a produção de acetato quanto de acetil-CoA, que atua como substrato do ciclo do ácido cítrico (Figura 1) (HORTON, 2000; LENHIGNER et al., 2007).

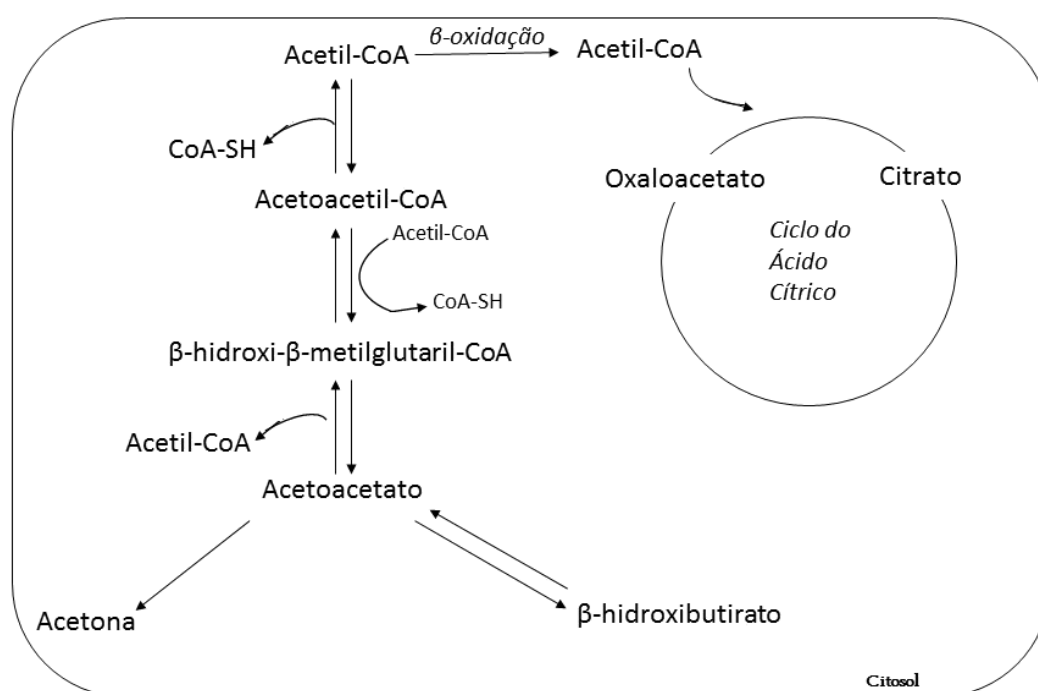


Figura 1: Formação de β -hidroxibutirato (adaptado de LEHNINGER et al., 2007)

Avaliando-se a detecção de propionato, não se observou diferença tanto na sua produção quanto em sua S/E. Observou-se que este ácido orgânico foi produzido somente pelos cisticercos em estágio inicial. Por sua vez, Fraga et al. (2012a), detectaram um aumento na produção de propionato pelo estágio final tratado, *in vivo*, com 11,5 mg/Kg de albendazol, quando comparado com o grupo controle. Provavelmente este ácido orgânico foi consumido para a produção de succinato, utilizando uma via alternativa de produção de energia, devido à influência, pelos fármacos, na captação de glicose (HORTON, 2000; LENHIGNER et al., 2007; FRAGA et al., 2012a) (Figura 2).

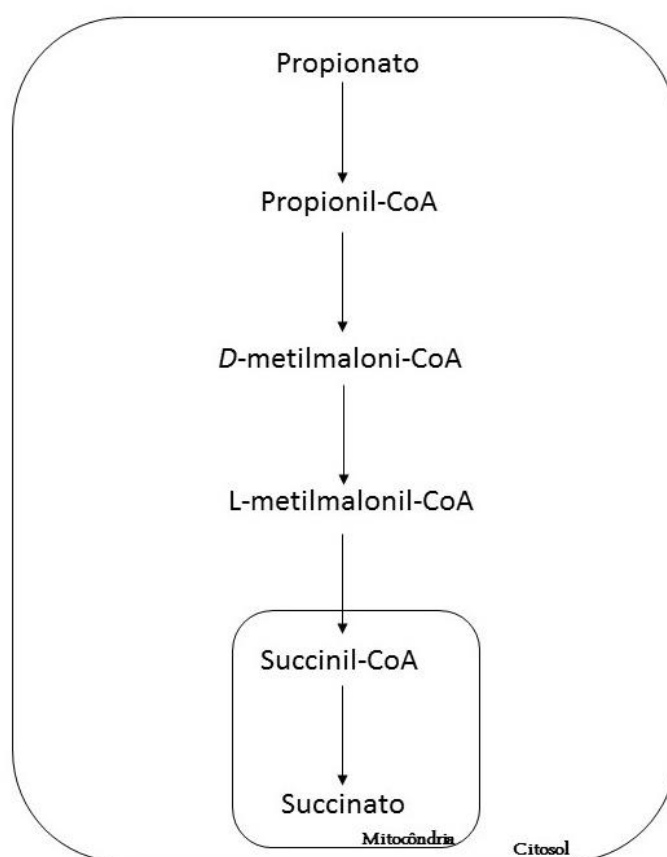


Figura 2: Produção de succinato a partir de propionato (adaptado de LENHIGNER et al., 2007).

Ainda que não se tenha observado diferença na S/E de creatinina e proteínas totais, observou-se um aumento gradativo na S/E de fumarato pelos cisticercos tratados com ABZSO ($p < 0,05$), bem como uma maior S/E de ureia pelos cisticercos também tratados com ABZSO ($p < 0,05$). Este resultado está de acordo com os trabalhos de Fraga et al. (2012a, 2012b). Acredita-se que o aumento de fumarato seja em consequência do aumento da ureia (Figura 3), pois, assim como ocorre em mamíferos, os cisticercos podem ter utilizado a degradação de proteínas como via alternativa de produção de energia, na tentativa de suprir a influência dos fármacos na captação de glicose.

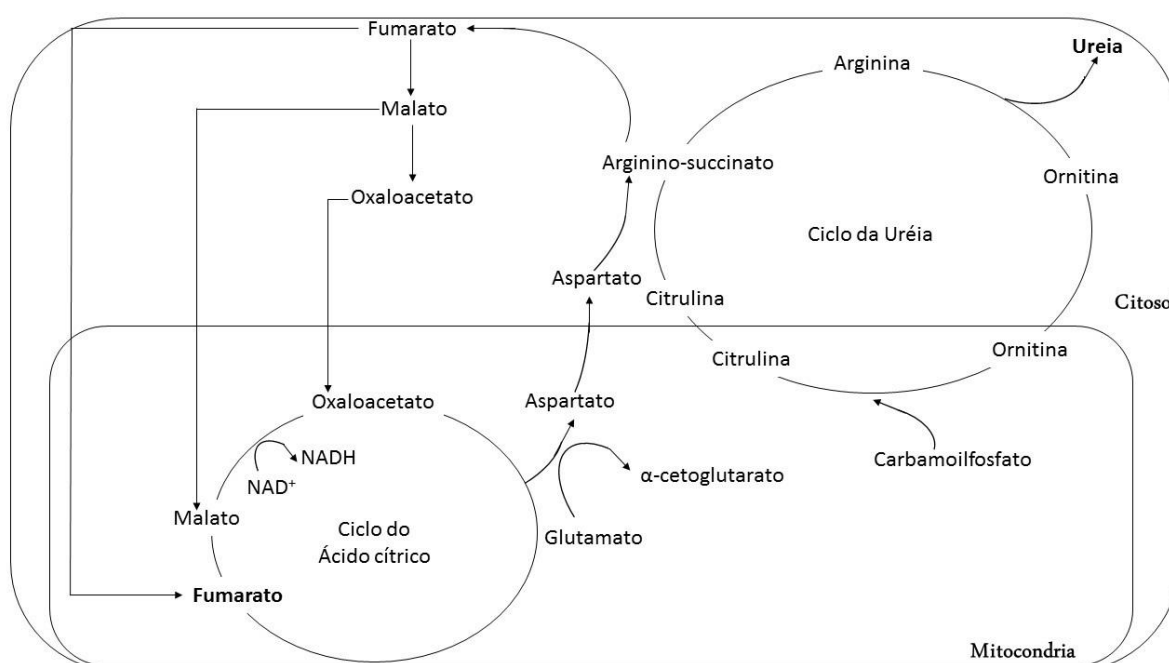


Figura 3: Ciclo da ureia (adaptado de LENHINGER et al., 2007).

Conclui-se, assim, que apesar de não promoverem o bloqueio total na captação de glicose, o ABZSO e o RCB20 influenciaram em sua captação, induzindo o parasito a utilizar vias alternativas de produção de energia, como as vias de oxidação de ácidos graxos e de degradação de proteínas. Além disso, apesar de mais solúvel e estável, o RCB20 não demonstrou atividade bioquímica diferente do ABZSO.

4. Bibliografia

- AROCKER-METTINGER, E.; HUBER-SPITZY, V.; AUER, H.; GRABNER, G.; STUR, M. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye: A case report. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, Alemanha, v. 1, n. 201, p. 34-37, 1992.
- BAGRADE, G.; KIRJUŠINA, M.; VISMANIS, K.; OZOLINŠ, J. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *Journal of Helminthology*, Inglaterra, n. 83, p. 63–68, 2009.
- CHERMETTE, R.; BUSSIERAS, J.; MARIONNEAU, J.; BOYER, E.; ROUBIN, C.; PROPHETTE, B.; MAILLARD, H.; FABIANI, B. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, França, v. 4, n. 179, p. 777-783, 1995.
- FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 131, p. 111-115, 2012a.
- FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxilic acid cycle in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 130, p. 146-151, 2012b.
- FRANÇOIS, A.; FAVENNEC, L. P.; CAMBON-MICHOT, C.; GUEIT, I.; BIGA, N.; TRON, F.; BRASSEUR, P.; HEMET, J. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: A new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome?. *The American journal of Surgical Pathology*, Estados Unidos, v. 4, n. 22, p. 488-492, 1998.
- HELDWEIN, K.; BIEDERMANN, H.; HAMPERI, W.; BRETZEL, G.; LOSCHER, T.; LAREGINA, D.; FROSCH, M.; BÜTTNER, D. W.; TAPPE, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Estados Unidos, v. 1, n.75, p. 108-111, 2006.
- HERNÁNDEZ-LUIS, F.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; CASTILLO, R.; NAVARRET-VÁZQUEZ, G.; SORIA-ARTECHE, O.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M.; YÉPEZ-MULIA, L. Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medical Chemistry*, França, v. 45, n. 7, p. 3135-3141, 2010.

HOBERG, E. P.; JONES, A.; RAUSCH, R. L.; EMON, K. S.; GARDNER, S. L. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda: Taeniidae). *The Journal of Parasitology*, Estados Unidos, n. 86, p. 89-98, 2000.

HORTON, J. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, Inglaterra, n. 121, p. S113-S132, 2000.

KLINKER, H.; TINTELNOT, K.; JOERES, R.; MÜLLER, J.; GROSS, U.; SCHMIDT-ROTTE, H.; LANDWEHR, P.; RICHTER, E. *Taenia crassiceps* infection in AIDS. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, Alemanha, n. 117, p. 133-138, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Quarta edição. São Paulo: Sarvier, 2007. 1202 p.

MAILLARD, H.; MARIONNEAU, J.; PROPHETTE, B.; BOYER, E.; CELERIER, P. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. *AIDS*, Inglaterra, n. 12, p. 1551-1552, 1998.

MARQUES, M. P.; TAKAYANAGI, O. M.; LANCHOTE, V. I. Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brasil, n. 35, p. 261-269, 2002.

MÁRQUEZ-NAVARRO, A.; PÉREZ-REYES, A.; ZEPEDA-RODRIGUES, A.; REYNOSO-DUCOING, O.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; CASTILLO, R.; YÉPEZ-MULI, A. L.; AMBROSIO, J. R. RCB20, an experimental benzimidazole derivative, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 112, p. 2215-2226, 2013.

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; CEDILLO, R.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; YÉPEZ, L.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; VALDEZ, J.; MORALES, R.; CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2 (Trifluoromethyl) benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Inglaterra, v. 11, n. 2, p. 187-190, 2001.

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; YÉPEZ, L.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; TAPIA, A.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; CEDILLO, R.; GONZÁLEZ, J.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ-GUEIRO, M.; CASTILLO, R. Synthesis and antiparasitic activity of

albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Inglaterra, v. 11, n. 21, p. 4615-4622, 2003.

NAVARRET-VÁZQUEZ, G.; ROJANO-VILCHIS, M. M.; YÉPEZ-MULIA, L.; MELÉNDEZ, V.; GERENA, L.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; CASTILLO, R.; HERRNÁNDEZ-LUIS, F. Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole bioisosteres. *European Journal of Medical Chemistry*, França, v. 41, n. 1, p. 135-141, 2006.

RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; MENDONZA-HERNÁNDEZ, G.; PARDO, J. P. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from larval *Taenia crassiceps* (cysticerci): purification and properties. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 102, p. 1351-1357, 2008.

RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; URIBE, A.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular and Biochemical Parasitology*, Holanda, n. 133, p. 61-69, 2004.

SAEED, I.; MADDUX-HYTTEL, C.; MONRAD, J.; KAPEL, C. M. O. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, Holanda, v. 1-3, n. 139, p. 168-179, 2006.

SCHMIDT, J. Effects of benzimidazole anthelmintics as microtubule-active drugs on the synthesis and transport of surface glycoconjugates in *Hymenolepis microstoma*, *Echinostoma caproni* and *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 84, p. 362-368, 1998.

SHEA, M.; MABERLEY, A. L.; WALERS, J.; FREEMAN, R. S.; FALLIS, A. M. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, Estados Unidos, n. 77, p. 778-783, 1973.

STIEN, A.; VOUTILAINEN, L.; HAUSISALMI, V.; FUGLEI, W.; MORK, T.; YOCCOZ, N. G.; IMS, R. A.; HENTTONEN, H. Intestinal parasites of the Arctic fox in relation to the abundance and distribution of intermediate hosts. *Parasitology*, Inglaterra, v. 1, n. 137, p. 149-157, 2010.

VENKATESAN, V. Albendazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Inglaterra, n. 4, p. 145-147, 1998.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 120, p. 221-226, 2008.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, v. 2, n. 122, p. 208-211, 2009.

VINAUD, M. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps* organic acids detect in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos n. 116, p. 335-339, 2007.

WILLMS, K.; ZURABIAN, R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*, Inglaterra, v. 3, n. 137, p. 335-346, 2010.

WÜNSCHMANN, A., GARLIE, V.; AVERBECK, G.; KURTZ, H.; HOBERG, E. P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary*, Estados Unidos, n. 15, p. 484-488, 2003.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e de Espectrofotometria permitiram avaliar quantitativamente e qualitativamente os indicadores do metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* submetidos ao tratamento *in vitro* com o sulfóxido de albendazol e com o RCB20.

Foi possível detectar que, apesar de mais solúvel e estável que o ABZSO, o RCB20 não demonstrou atividade bioquímica diferente, isto é, a adição de um grupo naftoloxi na posição 5, um grupo trifluorometil na posição 2 e um cloro na posição 6, não alterou o mecanismo bioquímico do sistema 2 (trifluorometil) -1 H-benzimidazol.

Entretanto, apesar de não promover o bloqueio total na captação de glicose, o RCB20 influenciou em sua captação, induzindo o parasito a utilizar vias alternativas de produção de energia, como as vias de oxidação de ácidos graxos e de degradação de proteínas.

Diante dos resultados aqui encontrados, acredita-se que estudos *in vivo* devem ser realizados para a comprovação da atividade anti-helmíntica do RCB20, assim como avaliar sua toxicidade ao hospedeiro mamífero. Além disso, estudos moleculares, tais como o estudo das proteínas expressas, após o tratamento, devem ser realizados para se constatar o real mecanismo de ação do composto.

Em decorrência de casos de resistência a diversos anti-helmínticos, é necessário prosseguir com pesquisas acerca da otimização e melhoramento molecular dos fármacos existentes, bem como para desenvolver novas moléculas com potencial anti-helmíntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROCKER-METTINGER, E.; HUBER-SPITZY, V.; AUER, H.; GRABNER, G.; STUR, M. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye: A case report. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, Alemanha, v. 1, n. 201, p. 34-37, 1992.

BAGRADE, G.; KIRJUŠINA, M.; VISMANIS, K.; OZOLINŠ, J. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *Journal of Helminthology*, Inglaterra, n. 83, p. 63–68, 2009.

BALLWEBER, L. R. *Taenia crassiceps* subcutaneous cysticercosis in an adult dog. *The Veterinary Record*, Inglaterra, v. 23, n. 165, p. 693-694, 2009.

BASSO, W.; RÜTTER, M.; DEPLAZES, P.; GRIMM, F. Generalized *Taenia crassiceps* cysticercosis in a chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Parasitology*, Holanda, n. 199, p.116-120, 2014.

BRUŽINSKAITĖ-SCHMIDHALTER, R.; ŠARKŪNAS, M.; MALAKAUSKAS, A.; MATHIS, A.; TORGERSON, P. R.; DEPLAZES, P. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Lithuania. *Parasitology*, Inglaterra, n. 139, p. 120–127, 2012.

CHAMBERS, E.; RYAN, L. A.; HOEY, E. M.; TRUDGETT, A.; MCFERRAN, N. V.; FAIRWEATHER, I.; TIMSON, D. J. Liver fluke β -tubulin isotype 2 binds albendazole and is thus a probable target of this drug. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 107, p. 1257–1264, 2010.

CHERMETTE, R.; BUSSIERAS, J.; MARIONNEAU, J.; BOYER, E.; ROUBIN, C.; PROPHETTE, B.; MAILLARD, H.; FABIANI, B. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, França, v. 4, n. 179, p. 777-783, 1995.

CHERMETTE, R.; BUSSIERAS, J.; MIALOT, M.; RAYNAL, P. C. Subcutaneous *Taenia crassiceps* cysticercosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Estados Unidos, v. 2, n. 203, p. 263-265, 1993.

CHUCK, R. S.; OLK, R. J.; WEIL, G. J.; AKDUMAN, L.; BENENSON, I. L.; SMITH, M. E.; KAPLAN, H. J. Surgical removal of a subretinal proliferating cysticercus of *Taenia crassiceps*. *Archives of Ophthalmology*, Estados Unidos, n. 115, p. 562-563, 1997.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., Praziquantel, *Parasitology Research*, Alemanha, n. 90 p. S3-S9, 2003.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future?, *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Inglaterra, v 1, n. 68, p. 35-85, 1995.

CORBIN, I.; SIMCOFF, R.; NOVAK, M.; BLACKBURN, B. J. Metabolism of [3-¹³C]-pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, Alemanha, n.84, p. 516-518, 1998.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, Holanda, n. 86, p. 141-159, 2003.

DEL ARENAL, I. P.; FLORES, A. G.; POOLE, R. K.; ESCAMILLA, J. E. *Taenia crassiceps* metacestodes have cytochrome oxidase aa₃ but not cytochrome o functioning as terminal oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Holanda, n. 114, p. 103-109, 2001.

DEL ARENAL, I. P.; RUBIO, M. E.; RAMIREZ, J.; RENDÓN, J. L.; ESCAMILLA, J. E. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *Parasitology International*, Holanda, n. 54, p. 185-193, 2005.

EL-ON, J. Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta Tropica*, Holanda, n. 85, p. 243-252, 2003.

ENDEN, E. Pharmacotherapy of helminth infection. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, Inglaterra, v. 3, n. 10, p. 435-451, 2009.

EVERHART, M. E.; KUHN, R. E.; ZELMER, D. A. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *The Journal of Parasitology*, Estados Unidos, n. 90, p. 79-84, 2004.

FRAGA, C. M. *Avaliação bioquímica in vivo do tratamento anti-helmíntico em cisticercos de Taenia crassiceps*. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2011.

FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 131, p. 111-115, 2012a.

FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 130, p. 146-151, 2012b.

FRANÇOIS, A.; FAVENNEC, L. P.; CAMBON-MICHOT, C.; GUEIT, I.; BIGA, N.; TRON, F.; BRASSEUR, P.; HEMET, J. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: A new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome?. *The American journal of Surgical Pathology*, Estados Unidos, v. 4, n. 22, p. 488-492, 1998.

FREEDMAN, H.; LUCHKO, T.; LUDUENA, R. F.; TUSZYNSKI, J. A. Molecular dynamics modeling of tubulin C-terminal tail interactions with the microtubule surface. *Proteins*, Estados Unidos, n. 79, p. 2968–2982, 2011.

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

GOESSERINGER, N.; LINDENBLATT, N.; MIHIC-PROBST, D.; GRIMM, F.; GIOVANOLI, P. *Taenia crassiceps* upper limb fasciitis in a patient with untreated acquired immunodeficiency syndrome and chronic hepatitis C infection – the role of

surgical debridement. *Journal of Plastic, Reconstructive e Aesthetic Surgery*, Holanda, n. 64, p. 174-176, 2011.

HELDWEIN, K.; BIEDERMANN, H.; HAMPERI, W.; BRETZEL, G.; LOSCHER, T.; LAREGINA, D.; FROSCH, M.; BÜTTNER, D. W.; TAPPE, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Estados Unidos v. 1, n.75, p. 108-111, 2006.

HERNÁNDEZ-LUIS, F.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; CASTILLO, R.; NAVARRET-VÁZQUEZ, G.; SORIA-ARTECHE, O.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M.; YÉPEZ-MULIA, L. Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medical Chemistry*, França, v. 45, n. 7, p. 3135-3141, 2010.

HOBERG, E. P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infecion*, França, n. 4, p. 859-866, 2002.

HOBERG, E. P.; JONES, A.; RAUSCH, R. L.; EMON, K. S.; GARDNER, S. L. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda: Taeniidae). *The Journal of Parasitology*, Estados Unidos, n. 86, p. 89-98, 2000.

HOBERG, E. P.; EBINGER, W.; RENDER, J. A. Fatal cysticercosis by *Taenia crassiceps* (Cyclophyllidae: Taeniidae) in a presumed immunocompromised canine host. *The Journal of Parasitology*, Estados Unidos, v. 6, n. 85, p. 1174-1178, 1999.

HORTON, J. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, Inglaterra n. 121, p. S113-S132, 2000.

HORTON, R. J. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Tropica*, Holanda, n. 64, p. 79-93, 1997.

KLINKER, H.; TINTELNOT, K.; JOERES, R.; MÜLLER, J.; GROSS, U.; SCHMIDT-ROTTE, H.; LANDWEHR, P.; RICHTER, E. *Taenia crassiceps* infection in AIDS. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, Alemanha, n. 117, p. 133-138, 1992.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Quarta edição. São Paulo: Sarvier, 2007. 1202 p.

LI, W.; GUO, Z.; DUO, H.; FU, Y.; PENG, M.; SHEN, X.; TSUKADA, H.; IRIE, T.; NASU, T.; HORII, Y.; NONAKA, N. Survey on Helminths in the Small Intestine of Wild Foxes in Qinghai, China. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Japão, v. 10, n. 75, p. 1329–1333, 2013.

LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B. C.; SOARES, V. E.; NUNES, J. L. N.; TEIXEIRA, W. F. P.; MACIEL, W. G.; BUZZULINI, C.; PEREIRA, J. C. M.; FELIPPELLI, G.; SOCCOL, V. T.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Historic of therapeutic efficacy of albendazole sulphoxide administered in different routes, dosages and treatment schemes, against *Taenia saginata* cysticercus in cattle experimentally infected. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 137, p. 14-20, 2014.

MAILLARD, H.; MARIONNEAU, J.; PROPHETTE, B.; BOYER, E.; CELERIER, P. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. *AIDS*, Inglaterra, n. 12, p. 1551-1552, 1998.

MARQUES, M. P.; TAKAYANAGI, O. M.; LANCHOTE, V. I. Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brasil, n. 35, p. 261-269, 2002.

MÁRQUEZ-NAVARRO, A.; CORNEJO-CORIA, M. C.; CEBADA-LÓPEZ, F.; SÁNCHEZ-MANZANO, R. M.; DÍAZ-CHINGUER, D. L.; NOGUEDA-TORRES, B. *Taenia saginata*: failure treatment in a child with 5-year long-lasting infection. *Gastroenterology Nursing: The Official Journal of The Society of Gastroenterology Nurses and Associates*, Estados Unidos, v. 2, n. 35, p. 125-127, 2012.

MÁRQUEZ-NAVARRO, A.; PÉREZ-REYES, A.; ZEPEDA-RODRIGUES, A.; REYNOSO-DUCOING, O.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; CASTILLO, R.; YÉPEZ-MULI, A. L.; AMBROSIO, J. R. RCB20, an

experimental benzimidazole derivative, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 112, p. 2215-2226, 2013.

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; CEDILLO, R.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; YÉPEZ, L.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; VALDEZ, J.; MORALES, R.; CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2 (Trifluoromethyl) benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Inglaterra, v. 11, n. 2, p. 187-190, 2001.

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; YÉPEZ, L.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; TAPIA, A.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; CEDILLO, R.; GONZÁLEZ, J.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ-GUEIRO, M.; CASTILLO, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Inglaterra, v. 11, n. 21, p. 4615-4622, 2003.

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; ROJANO-VILCHIS, M. M.; YÉPEZ-MULIA, L.; MELÉNDEZ, V.; GERENA, L.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; CASTILLO, R.; HERNÁNDEZ-LUIS, F. Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole bioisosteres. *European Journal of Medical Chemistry*, França, v. 41, n. 1, p. 135-141, 2006.

NTOUKAS, V.; TAPPE, D.; PFÜTZE, D.; SIMON, M.; HOLZMANN, T. Cerebellar cysticercosis caused by larval *Taenia crassiceps* tapeworm in immunocompetent woman, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, Estados Unidos, v. 19, n. 12, p. 2008-2011, 2013.

PALOMARES, F.; PALENCIA, G.; AMBROSIO, J. R.; ORTIZ, A.; COOK, H. J. Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps*: *in vitro* studies. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Inglaterra, n. 57, p. 482-488, 2006.

PALOMARES-ALONSO, F.; GONZÁLES, C. R.; BERNAD-BERNAD, M. J.; MONTIEL, M. D.; HERNÁNDEZ, G. P.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, I.; CASTRO-TORRES, N.; ESTRADA, E. P.; JUNG COOK, H. Two novel ternary

albendazole-cyclodextrin-polymer systems: dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia crassiceps* cysts. *Acta Tropica*, Holanda, v. 1, n. 113, p. 56-60, 2010.

RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; MENDONZA-HERNÁNDEZ, G.; PARDO, J. P. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from larval *Taenia crassiceps* (cysticerci): purification and properties. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 102, p. 1351-1357, 2008.

RENDÓN, J. L.; DEL ARENAL, I. P.; GUEVARA-FLORES, A.; URIBE, A.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular and Biochemical Parasitology*, Holanda, n. 133, p. 61–69, 2004.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 883 p.

RIESTSCHEL, G. Contribution to the knowledge of *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800) Rudolphi 1810 (Cestoda, Taeniidae). *Parasitology Research*, Alemanha, n. 65, p. 309-315, 1981.

ROJAS-AGUIRRE, Y.; YÉPEZ-MULIA, L.; CASTILLO, I.; LÓPEZ-VALLEJO, F.; SORIA-ARTECHE, O.; HERNÁNDEZ CAMPOS, A.; CASTILHO, R.; HERNANDEZ-LUIS, F. Studies on 6-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin association: Characterization, molecular modeling studies, and *in vivo* anthelmintic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Inglaterra, v. 2, n. 19, p. 789-797, 2011.

SAEED, I.; MADDOX-HYTTEL, C.; MONRAD, J.; KAPEL, C. M. O. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, Holanda, v. 1-3, n. 139, p. 168-179, 2006.

SCHMIDT, J. Effects of benzimidazole anthelmintics as microtubule-active drugs on the synthesis and transport of surface glycoconjugates in *Hymenolepis microstoma*, *Echinostoma caproni* and *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 84, p 362-368, 1998.

SHEA, M.; MABERLEY, A. L.; WALERS, J.; FREEMAN, R. S.; FALLIS, A. M. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, Estados Unidos, n. 77, p. 778-783, 1973.

STIEN, A.; VOUTILAINEN, L.; HAUSISALMI, V.; FUGLEI, W.; MORK, T.; YOCCOZ, N. G.; IMS, R. A.; HENTTONEN, H. Intestinal parasites of the Arctic fox in relation to the abundance and distribution of intermediate hosts. *Parasitology*, Inglaterra, v. 1, n. 137, p. 149-157, 2010.

TREJO-CHÁVEZ, H.; GARCÍA-VILCHIS, D.; REYNOSO-DUCOING, O.; AMBROSIO, J. R. *In vitro* evaluation of the effects of cysticidal drugs in the *Taenia crassiceps* cysticerci OFR strain using the fluorescent CellTracker CMFDA. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, v. 1, n. 127, p. 294-299, 2011.

VENKATESAN, V. Albendazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, Inglaterra, n. 4, p. 145-147, 1998.

VINAUD, M. C. *Vias do Metabolismo energético e respiratório em cisticercos de Taenia crassiceps in vivo e seu estudo in vitro sob ação de fármacos anti-helmínticos*. 2007. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2007.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 120, p. 221-226, 2008.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, v. 2, n. 122, p. 208-211, 2009.

VINAUD, M. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps* organic acids detect in cysticerci. *Experimental Parasitology*, Estados Unidos, n. 116, p. 335-339, 2007.

WEN, H.; NEW, R. R. C.; CRAIG, P. S. Diagnosis and treatment of human hydatidosis, *British Journal of Clinical Pharmacology*, Inglaterra, n. 35, p. 565-574, 1993.

WILLMS, K.; PRESAS, A. M. F.; JIMÉNEZ, J. A.; LANDA, A.; ZURABIÁN, R.; UGARTE, M. E. J.; ROBERT, L., Taeniid tapeworm responses to *in vitro* glucose. *Parasitology Research*, Alemanha, n. 96, p. 296-301, 2005.

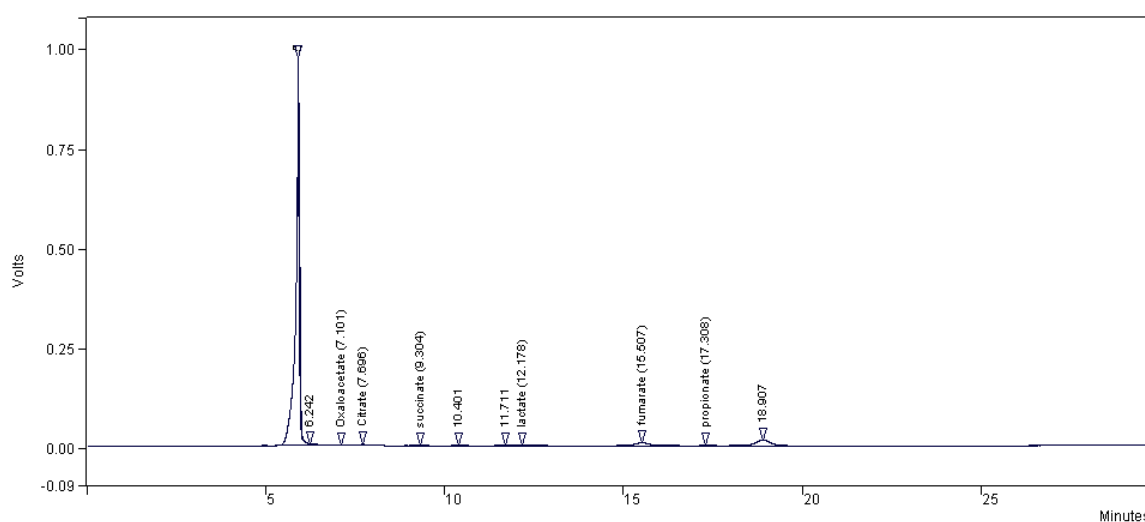
WILLMS, K.; ZURABIAN, R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*, Inglaterra, v. 3, n. 137, p. 335-346, 2010.

WÜNSCHMANN, A., GARLIE, V.; AVERBECK, G.; KURTZ, H.; HOBERG, E. P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary*, Estados Unidos, n. 15, p. 484-488, 2003.

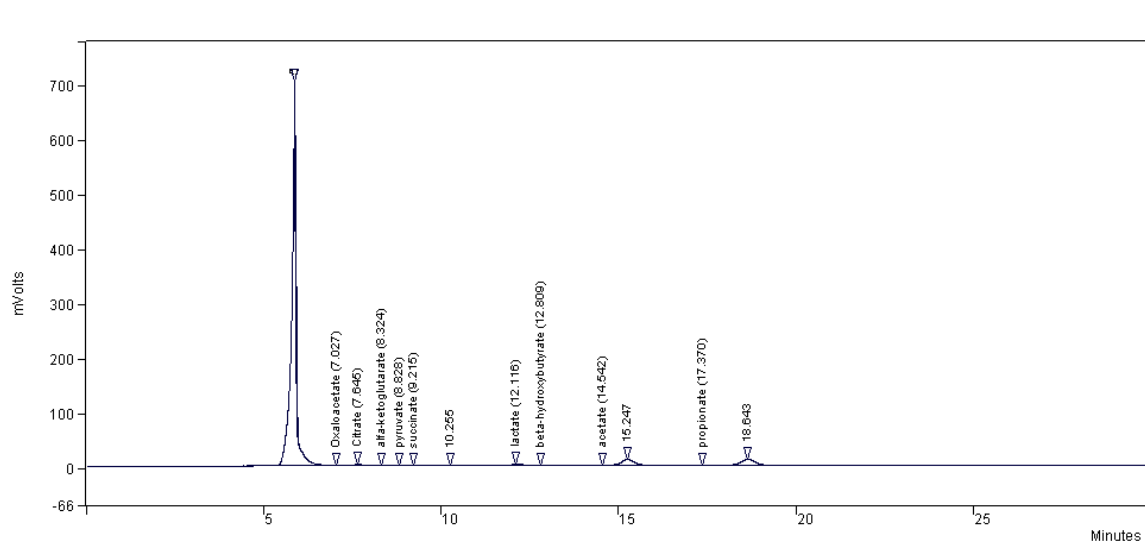
ZENKA, J.; KOPACEK, P.; VOKURKOVA, N. Studies on the properties of malic enzyme and malate dehydrogenase from *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800) cysticerci. *Folia Parasitologica*, República Checa, n. 34, p. 323-328, 1987.

ZENKA, J.; PROKOPIC, J. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarase reductase and succinate dehydrogenase in the larvae of *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800). *Folia Parasitologica*, República Checa, n. 34, p. 131-136, 1987.

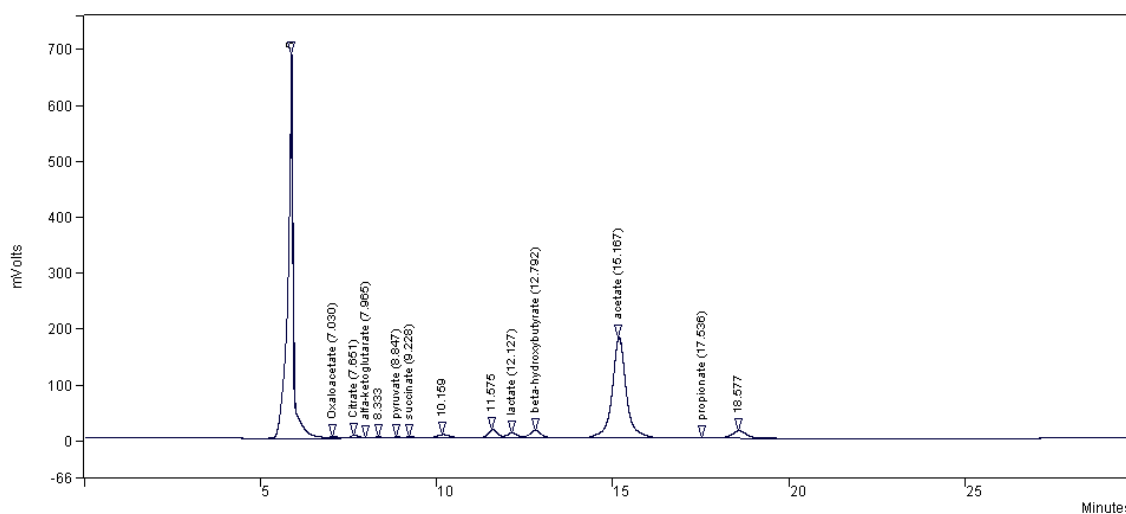
APÊNDICES



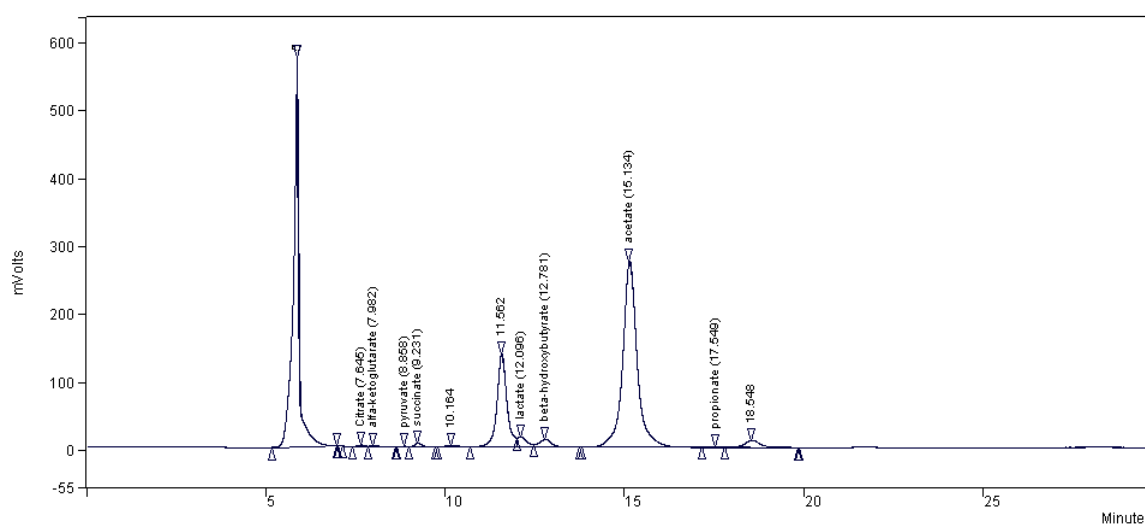
Cromatograma 1: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos presentes no meio RPMI.



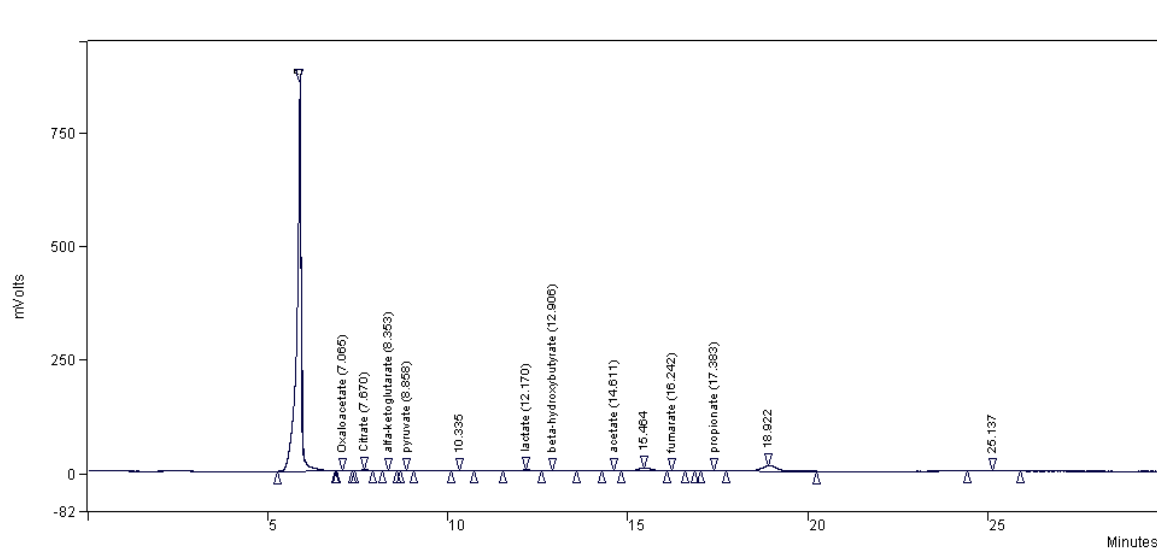
Cromatograma 2: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, pertencente ao grupo controle.



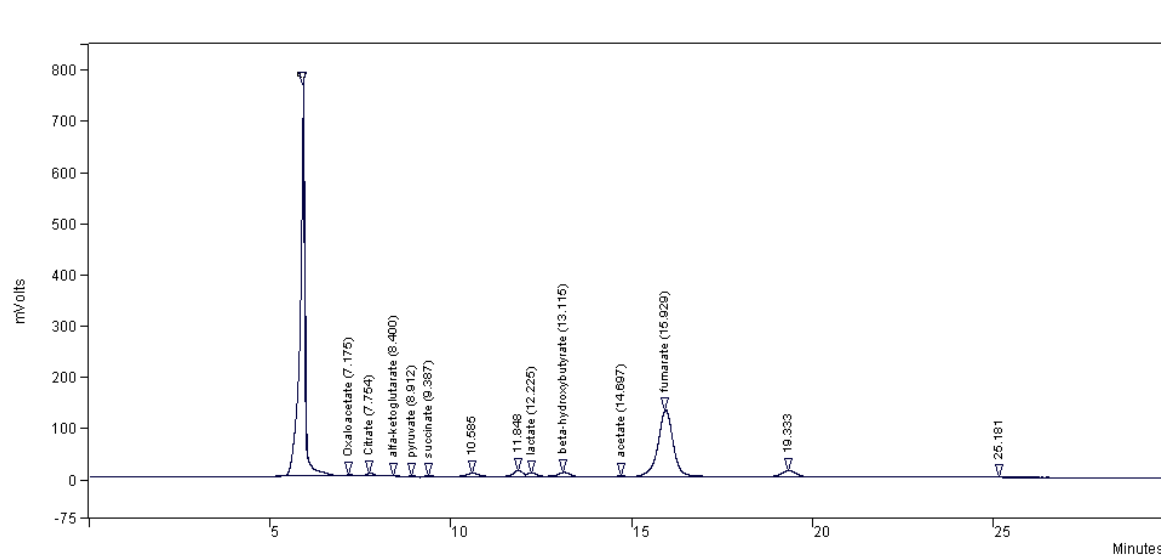
Cromatograma 3: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, pertencente ao grupo controle.



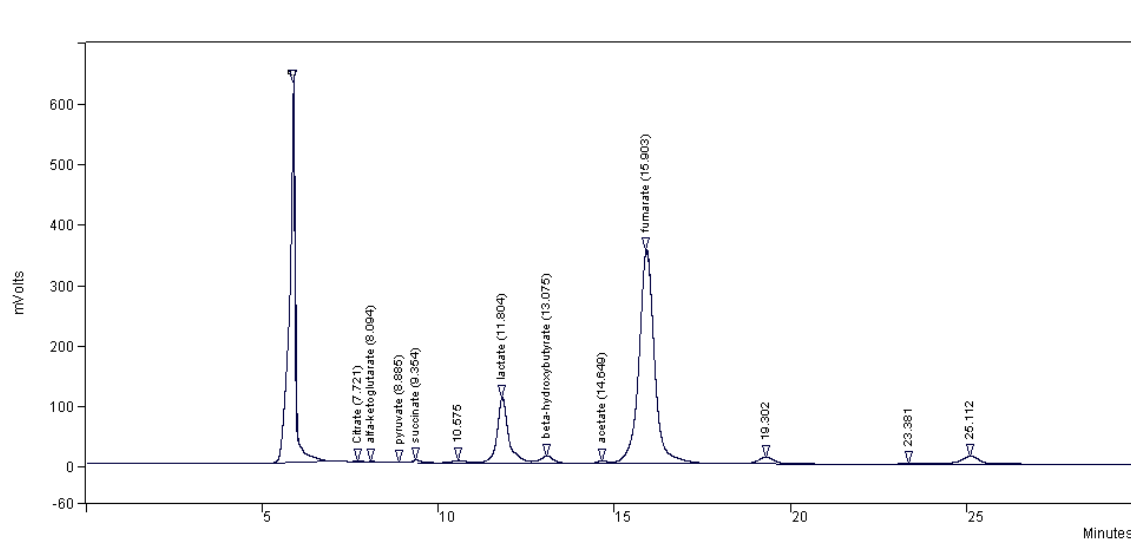
Cromatograma 4: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, pertencente ao grupo controle.



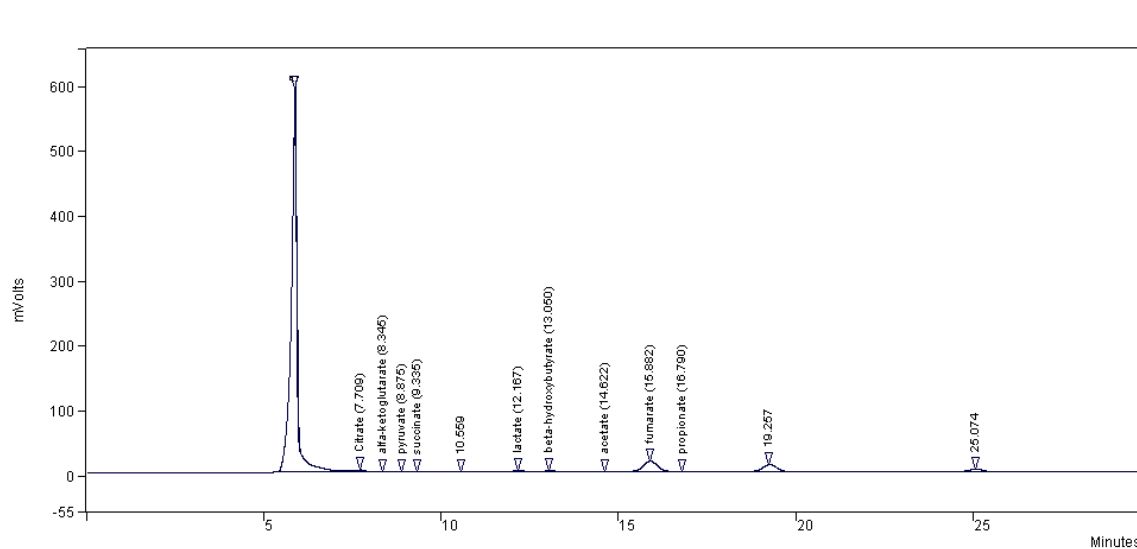
Cromatograma 5: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5μM.



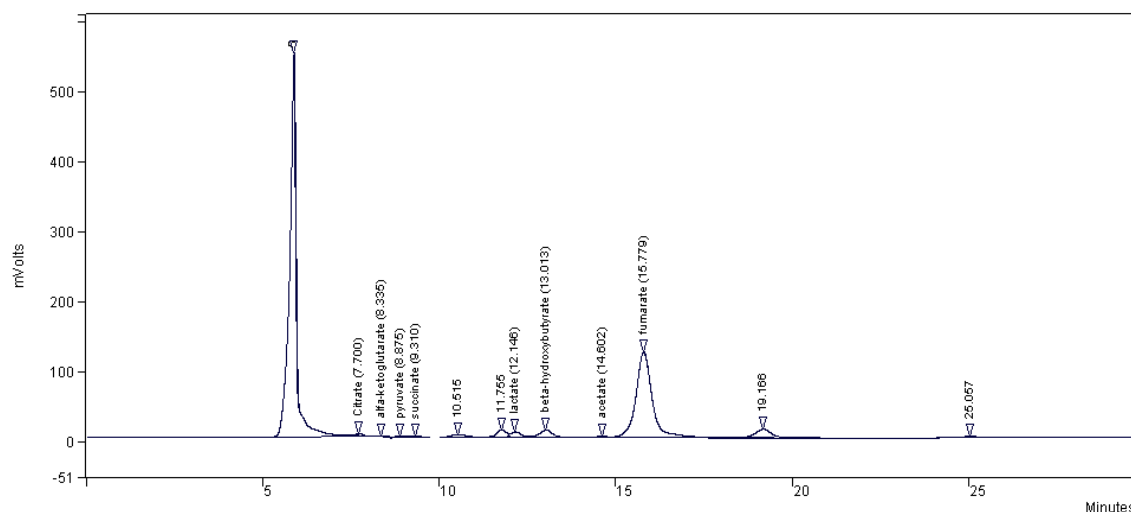
Cromatograma 6: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5μM.



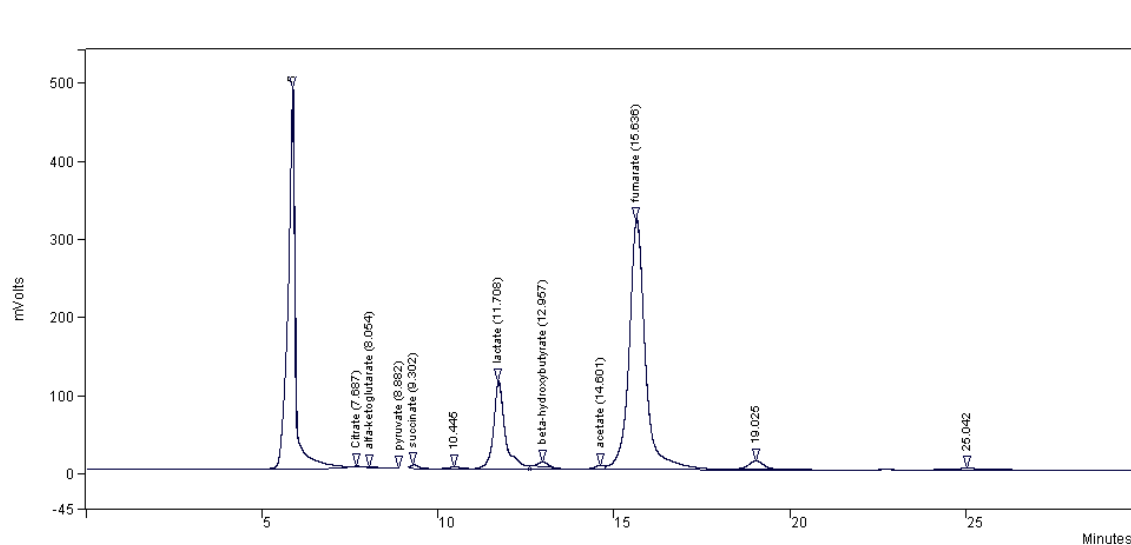
Cromatograma 7: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, tratados com sulfóxido de albendazol a 6,5μM.



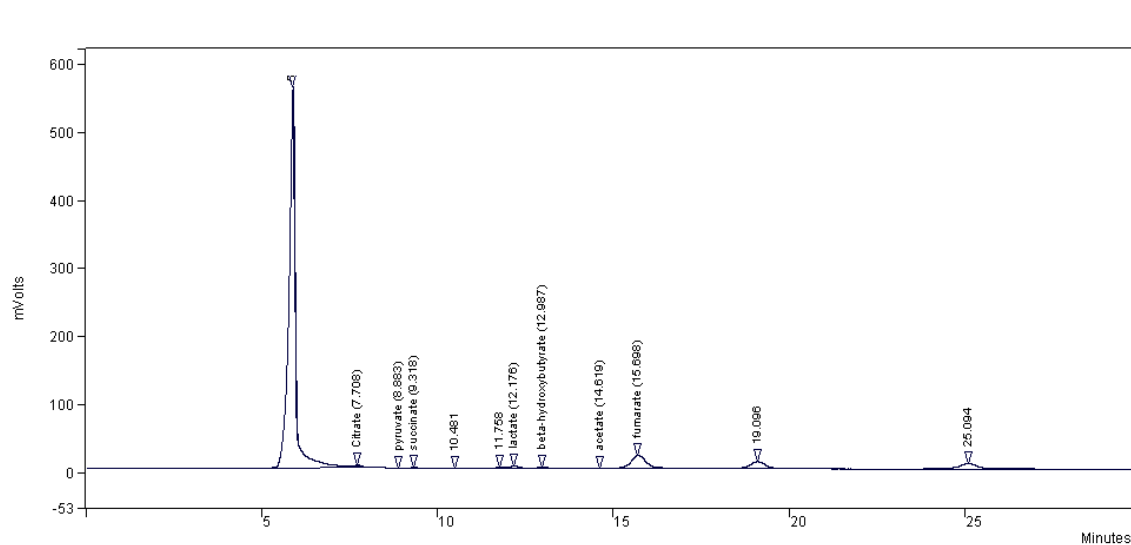
Cromatograma 8: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, tratados com sulfóxido de albendazol a 13μM.



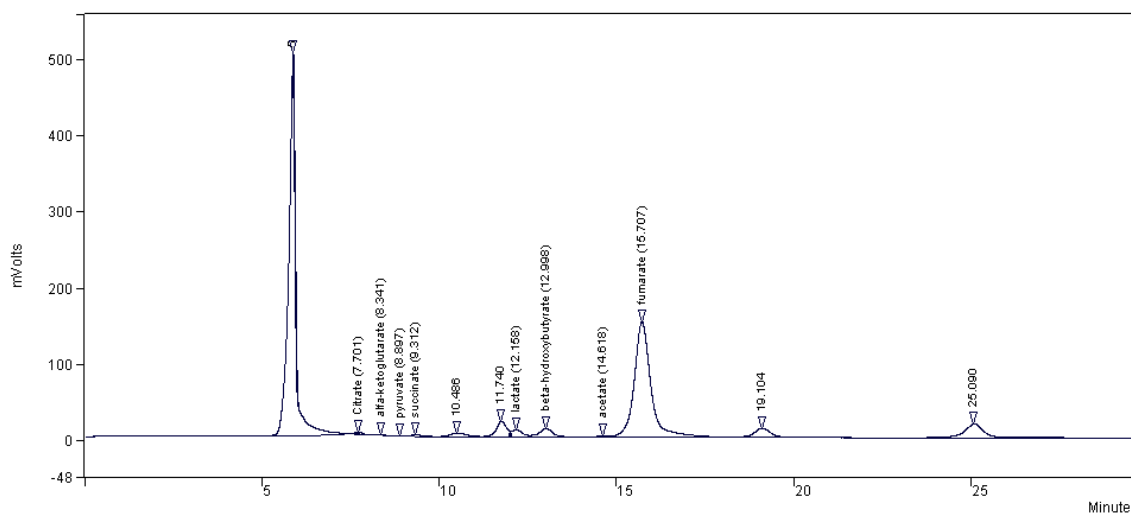
Cromatograma 9: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, tratados com sulfóxido de albendazol a 13μM.



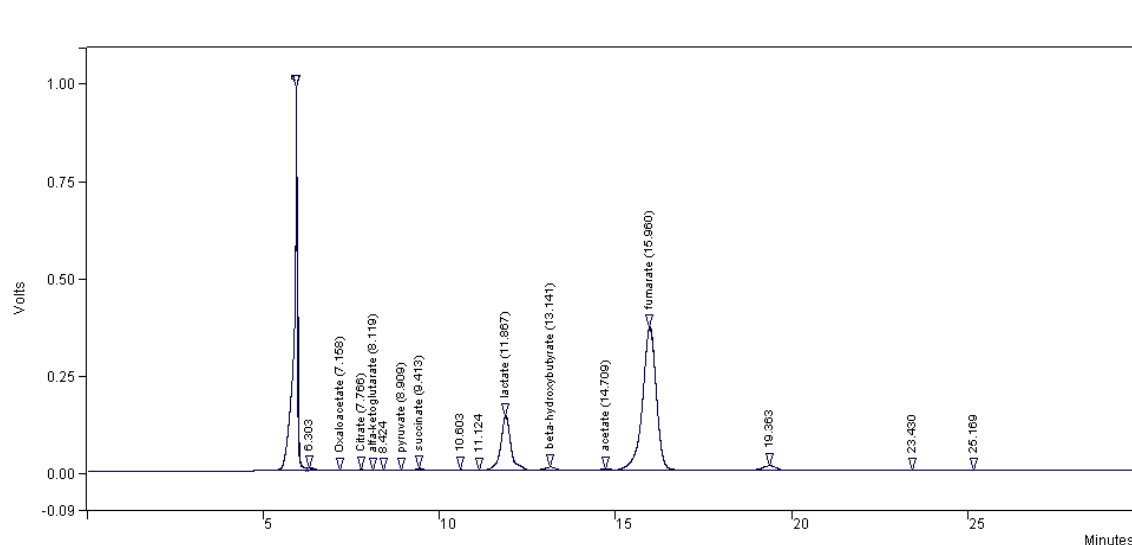
Cromatograma 10: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, tratados com sulfóxido de albendazol a 13μM.



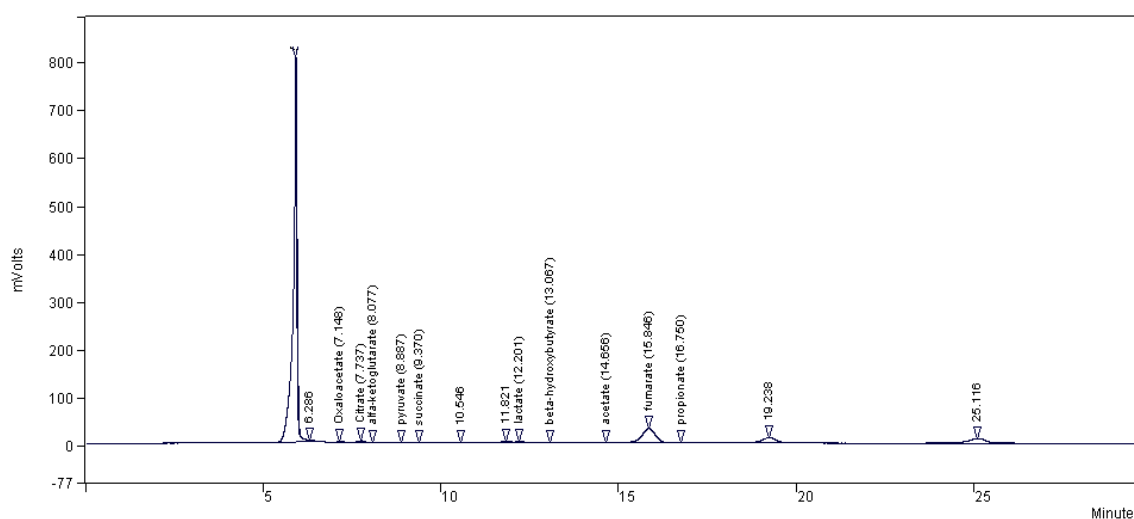
Cromatograma 11: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, tratados com RCB20 a 6,5μM.



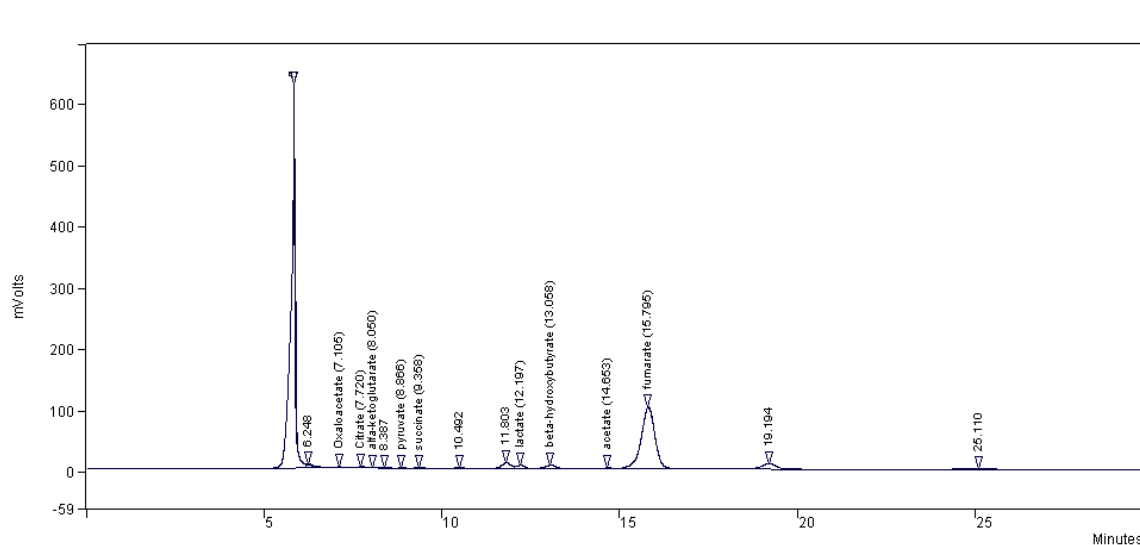
Cromatograma 12: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, tratados com RCB20 a 6,5μM.



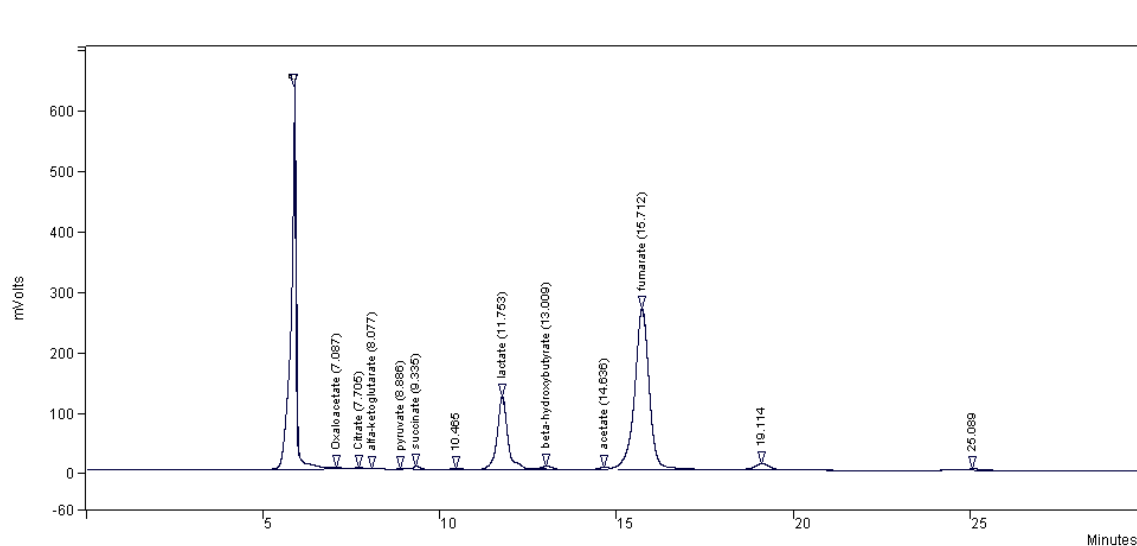
Cromatograma 13: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, tratados com RCB20 a 6,5μM.



Cromatograma 14: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, tratados com RCB20 a 13μM.



Cromatograma 15: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio larval, tratados com RCB20 a 13 μM.



Cromatograma 16: Detecção *in vitro* de ácidos orgânicos produzidos por cisticercos de *T. crassiceps* em estágio final, tratados com RCB20 a 13 μM.

ANEXOS

From: Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA <ceua.ufg@gmail.com>;
To: <mvinaud@yahoo.com.br>; <marinacv@iptsp.ufg.br>;
Subject: Notificação de Aprovação de Emenda em Projeto - CEUA/PRPPG/UFG
Sent: Wed, Apr 11, 2012 3:00:05 PM

Prezada Pesquisadora Marina Clare Vinaud,

comunicamos que a solicitação de emenda no **Protocolo n. 011/11**, intitulado "Caracterização do Efeito Inibitório de Fármacos Anti-helmínticos em Enzimas de Via Glicolítica da Neurocisticercose Experimental", foi **Aprovada** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG*.

Reiteramos a importância desse Parecer Consustanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG Relatórios Parciais constando informações sobre o desenvolvimento da pesquisa a partir da finalização da coleta de dados, bem como um Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA.

Atenciosamente,

--

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

Partial reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs

Leticia de Almeida Leandro · Carolina Miguel Fraga ·
Ruy de Souza Lino Jr · Marina Clare Vinaud

Received: 4 November 2013 / Accepted: 10 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Neurocysticercosis (NCC) is the most common helminthic infection and neglected disease of the central nervous system. It is the leading cause of acquired epilepsy and seizures worldwide. Therefore, to study this important neglected disease, it is important to use experimental models. There is no report in the literature on how the parasite's metabolism reacts to antihelminthic treatment when it is still within the central nervous system of the host. Therefore, the aim of this study was to investigate the energetic metabolism of cysticerci experimentally inoculated in the encephala of BALB/c mice after treatment with low dosages (not sufficient to kill the parasite) of albendazole (ABDZ) and praziquantel (PZQ). BALB/c mice were intracranially inoculated with *Taenia crassiceps* cysticerci and, after 30 days, received treatment with low dosages of ABDZ and PZQ. After 24 h of treatment, the mice were euthanized, and the cysticerci were removed and analyzed through high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the organic acids related to the energetic metabolism of the parasite. The partial reverse of the TCA cycle was enhanced by the ABDZ and PZQ treatments both with the higher dosage, as the organic acids of this pathway were significantly increased when compared to the control group and to the other dosages. In conclusion, it was possible to detect the increase of this pathway in the parasites that were exposed to low dosages of ABDZ and PZQ, as it is a mechanism that would amplify the energy production in a hostile environment.

L. de Almeida Leandro · C. M. Fraga · R. de Souza Lino Jr ·
M. C. Vinaud (✉)
Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of
Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, Goiás 74650-050, Brazil
e-mail: marinavinaud@gmail.com