

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

LILIAN CRISTINA MORAIS DE ANDRADE

**Avaliação do comportamento metabólico de cisticercos de
Taenia crassiceps cultivados *in vitro* e expostos a condições
estressantes**

**Goiânia
2013**

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

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

Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Lilian Cristina Moraes de Andrade		
E-mail:	lilian19farma@yahoo.com.br		
e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Cargo empregatício do autor		Secretaria de Saude de Niteroi	
Instituição de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 01.105.626/0001-25
Título:	Avaliação do metabolismo energético de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cultivados <i>in vitro</i> e expostos a condições estressantes		
Palavras-chave: <i>Taenia crassiceps</i> , Praziquantel, Albendazol			
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:			
Área de concentração:		Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro	
Data de defesa: (dd/mm/aaaa)		06/09/2013	
Programa de Pós-Graduação:		Em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro	
Orientador (a):	Marina Clare Vinaud		
E-mail:	marinavinaud@gmail.com		
Orientador (a):*	Ruy de Souza Lino Junior		
E-mail:			

Assinatura do CPF quando não constar no SisPG

Informações de acesso ao documento:

Concordo com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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

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

Assinatura: _____ Data: ____ / ____ / ____

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

LILIAN CRISTINA MORAIS DE ANDRADE

**Avaliação do comportamento metabólico de cisticercos de
Taenia crassiceps cultivados *in vitro* e expostos a condições
estressantes.**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Marina Clare
Vinaud

**Goiânia
2013**

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

MORAIS DE ANDRADE, LILIAN CRISTINA

Avaliação do comportamento metabólico de cisticercos de *Taenia crassiceps* cultivados in vitro e expostos a condições estressantes [manuscrito] / LILIAN CRISTINA MORAIS DE ANDRADE. - 2013. x, 62 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marina Clare Vinaud; co-orientadora Dra. Ruy de Souza Lino Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2013.

Bibliografia. Anexos.

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

1. *Taenia crassiceps*. 2. Albendazol. 3. Praziquantel. I. Clare Vinaud, Marina, orient. II. de Souza Lino Junior, Ruy, co-orient. III. Título.

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

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Lilian Cristina Moraes de Andrade

Orientador (a): Marina Clare Vinaud

Membros:

1. Marina Clare Vinaud (IPTSP/UFG)

2. Tatiane Luiza Costa (HC/UFG)

3. Ana Maria de Castro (IPTSP/UFG)

SUPLENTES:

1. José Clecildo Barreto Bezerra (IPTSP/UFG)

2. Ruy de Souza Lino Junior (IPTSP/UFG)

3. Adelair Helena dos santos (IPTSP/UFG)

Data: 06/09/2013

Agradecimentos

Em primeira instância a Deus, pelo dom da vida que nos possibilita de modo infinito a experimentar desafios e conquistas;

Entretanto, este trabalho científico dificilmente seria concluído sem a colaboração e sem o apoio de muitos amigos. Expresso a todos minha gratidão e embora não seja possível mencionar todos agradeço em especial:

A minha orientadora, Marina Clare Vinaud por ter me aceito como orientanda e também pela competência, paciência, respeito e seriedade as quais sempre nortearam nossa relação educador/educando;

Aos amigos do LAERPH Luciana Damascena Silva, Carolina Miguel Fraga, Carolina Aguiar de Araújo Machado e Juliana Avelar pela ajuda prestimosa em todos os momentos desta jornada;

Aos Laboratórios de Patologia Experimental e do Laboratório de Citocinas do IPTSP/UFG pela valiosa colaboração;

Aos professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro do IPTSP/UFG;

Aos funcionários da Secretaria do programa de Pós-graduação, Zezinho e Karine pela responsabilidade e paciência;

Aos camundongos que possibilitaram com suas vidas o estudo e o avanço da ciência;

Aos Laboratórios Farmacêuticos Merck e Teuto pela gentileza em fornecerem os fármacos utilizados;

Ao meu irmão, pela inestimável ajuda nos primeiros e incertos momentos;

Aos meus pais, pelo incondicional apoio e crença em meus ideais.

A todos aqueles que acreditaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Jair Pinto de Andrade e Maria Rita de Andrade e a meu irmão Glauco de Moraes Andrade

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
DEDICATÓRIA	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1- INTRODUÇÃO	4
1.1- Caracterização do parasito <i>Taenia crassiceps</i> .	4
1.2- Epidemiologia	8
1.3- Metabolismo de <i>Taenia crassiceps</i>	9
1.4- Fármacos anti-helmínticos utilizados no tratamento da cisticercose	16
1.5- Glicose	19
1.6- Insulina	21
1.7- Transporte celular de glicose	23
1.8- Receptor de insulina	24
1.9- Tipos de insulinas comerciais	25
1.10- Influência da glicose e da insulina sobre cisticercos de <i>Taenia Crassiceps</i>	28
2- JUSTIFICATIVA	30
3- OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4- METODOLOGIA	33
4.1- Manutenção do ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	33
4.2- Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> utilizados no cultivo	33
4.3- Padronização dos reagentes de uso e preparo do meio de cultura	34
4.4- Extração e Análise de ácidos orgânicos secretados/excretados	37
4.5- Análises estatísticas	37
5- RESULTADOS	39
6- DISCUSSÃO	51

7- CONCLUSÕES	56
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV-Ácidos graxos voláteis

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

CoA- Coenzima A

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

HIV -Human immunodeficiency vírus

HPLC- high performance liquid chromatography

IPTSP- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LAERPH- Laboratório de Estudos da Relação Parasito Hospedeiro

mL- Mililitros

mM-Milimol

ND-Não detectado

OAA- Oxaloacetato

ORF-Original fox

PEP- Fosfoenolpiruvato

SE- Secretadas/excretadas

SIDA- Síndrome da imunodeficiência adquirida

T. crassiceps- Taenia crassiceps

T. solium- Taenia solium

U-Unidade

UFG-Universidade Federal de Goiás

µg-Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> com seus hospedeiros definitivos (1) – canídeos, intermediários (3) – roedores e paratênicos (5) – mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos	06
Figura 2- Características macroscópicas de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF, em estágio larval, estágio inicial e estágio final	07
Figura 3 – Catabolismo anaeróbico de carboidratos em helmintos	12
Figura 4 – Catabolismo de carboidratos em cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	14
Figura 5 – Classificação das insulinas comerciais	26
Figura 6 – Perfis de ação das insulinas comerciais	27
Figura 7- Fluxograma esquematizando o tratamento <i>in vitro</i> de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> expostos a glicose (mM/mL) e insulina (U/mL)	35
Figura 8- Fluxograma esquematizando o tratamento <i>in vitro</i> de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> expostos ao praziquantel 0.03 e 0.06 µg/mL e diferentes concentrações de glicose (mM/mL) e insulina (U/mL).	36
Figura 9- Fluxograma esquematizando o tratamento <i>in vitro</i> de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> expostos ao albendazol 0.05 e 0.075 µg/mL e diferentes concentrações de glicose (mM/mL) e insulina (U/mL).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* à diferentes concentrações de glicose e insulina. 40

Tabela 02 - Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* à diferentes concentrações de glicose e insulina. 42

Tabela 03 - Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao praziquantel em concentração de 0,03 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina. 44

Tabela 04 - Tabela 4- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao praziquantel em concentração de 0,06 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina. 45

Tabela 5- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao albendazol em concentração de 0,05 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina. 48

Tabela 6- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao albendazol em concentração de 0,075 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina. 49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânico secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* (em fase inicial) do grupo controle;

Anexo 2- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos *Taenia crassiceps* em fase inicial expostos a 0,03 µg/mL de praziquantel;

Anexo 3- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos *Taenia crassiceps* em fase inicial expostos a 0,06 µg/mL de praziquantel;

Anexo 4- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos *Taenia crassiceps* em fase inicial expostos a 0,05 µg/mL de albendazol;

Anexo 5- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos *Taenia crassiceps* em fase inicial expostos a 0,075 µg/mL de albendazol;

Anexo 6- Cromatograma da detecção *in vitro* de ácidos orgânicos secretados/excretados por cisticercos *Taenia crassiceps* em fase inicial expostos a glicose 56 mM/mL e insulina 1.5 U/mL.

RESUMO

Os cisticercos de *Taenia crassiceps* possuem similaridades antigênicas com cisticercos de *Taenia solium* e por este motivo, associado ao fato de uma relativa facilidade de sua manutenção em animais de laboratório, são utilizados como modelo experimental para estudos da cisticercose por *T. solium*.

O objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro* a influência da glicose e da insulina no metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* expostos aos fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel em baixas doses, e diferentes concentrações de glicose e insulina.

A glicose é a principal fonte de energia para estes parasitos tanto na fase larval quanto adultos e o glicogênio, que pode ser novamente convertido em glicose, é fonte de reserva energética, sendo encontrado armazenado em suas membranas.

Os cisticercos foram provenientes da cavidade peritoneal de camundongos fêmeas Balb/c infectados experimentalmente e mantidos no biotério do IPTSP/UFG. Após 24 horas de cultivo em meio RPMI® suplementado e adicionado de glicose, insulina glargina (LANTUS®, Sanofi Aventis), albendazol e praziquantel, foram retirados da placa e o meio foi congelado em nitrogênio líquido para ocorrer estase metabólica. Posteriormente o meio de cultura passou por um processo de extração sendo analisado em Cromatografia Líquida de Alta Performance com detector UV (CLAE) dos seguintes ácidos orgânicos oriundos do metabolismo de carboidratos (lactato, piruvato), metabolismo intermediário (citrato, α -cetoglutarato succinato, fumarato, malato, oxaloacetato) e metabolismo de ácidos graxos (β -hidroxibutirato e propionato). Foram detectados propionato e β -hidroxibutirato secretados por cisticercos de *T. crassiceps* indicando a oxidação de ácidos graxos como fonte de energia alternativa, utilizada em especial nos estádios de crescimento e também em situações de baixas concentrações de substâncias energéticas provenientes do hospedeiro. Em adição, a detecção de

ácidos orgânicos do ciclo do ácido cítrico nos cisticercos analisados confirma a aerobiose *in vitro* do estágio evolutivos inicial dos cisticercos.

Palavras chave: *Taenia crassiceps*, Albendazol, Praziquantel, Metabolismo, Avaliação *in vitro*, Insulina, Glicose, Ácidos orgânicos, CLAE.

ABSTRACT

Taenia crassiceps cysticerci possess antigenic similarities to *T. solium* cysticerci and because of this and added to the relative easiness in its maintenance in laboratory they are used as an experimental model to *T. solium* studies.

The objective of this study was to analyze the *in vitro* influence of glucose and insulin on the energetic and respiratory metabolism of *T. crassiceps* cysticerci exposed to low dosages of anti-helminthic drugs, albendazol and praziquantel, and also to different concentrations of glucose and insulin. Glucose is the main energy source to these parasites in their larval and adult stages and glycogen is their main energetic reserve. Glycogen may be converted into glucose in case of low glucose uptake and is stored in the cysticerci tegument.

The cysticerci were collected from the peritoneal cavity of BALB/c female mice experimentally infected and maintained in the animal facilities of IPTSP/UFG. After 24 hours of culture in RPMI culture medium supplemented and with glucose, glargine insulin (LANTUS®, Sanofi Aventis), albendazol and praziquantel, the cysticerci were removed and the medium was frozen in liquid nitrogen as to allow the metabolic stasis. Afterwards this culture medium was analyzed through HPLC as to permit the quantification of the following organic acids related to the carbohydrates metabolism: lactate and pyruvate, intermediary metabolism: citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate and oxaloacetate, fatty acids metabolism: β -hydroxybutyrate and propionate. It was possible to detect propionate and β -hydroxybutyrate secreted by *T. crassiceps* cysticerci which indicates the fatty acids oxidation as an alternative energy

source used by the initial stage cysticerci which are in rapid growth. Also the detection of organic acids from the citric acid cycle indicates the *in vitro* aerobiosis performed by the initial stage cysticerci.

Key words: *Taenia crassiceps*, Albendazole, Praziquantel, metabolism, *in vitro* evaluation, insulin, glucose, organic acids, HPLC

1- INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1- Caracterização do Parasito *Taenia crassiceps*

O cestódeo *Taenia crassiceps* (Zelder 1800; Rudolphi 1810) pertence ao filo Platyhelminthes, ordem Cyclophyllidea e família Taeniidae (Freeman 1962; Willms & Zurabian 2009). Em sua forma adulta, é capaz de parasitar canídeos como raposas árticas (*Vulpes lagopus*), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*) e doninhas (*Mustela sp.*), podendo também infectar cães domésticos (*Canis familiaris*). Estes animais atuam como hospedeiros definitivos do parasito (Loos-Frank 2000; Saeed et al. 2006; Bagrade et al. 2009; Willms & Zurabian 2009; Stien et al. 2010).

Na sua forma larval, também chamada *Cysticercus longicollis* Rudolphi (1810), foi descrito infectando marmotas (*Marmota monax*) e camundongos (*Peromyscus sp.*), sendo que estes animais representam hospedeiros intermediários de *T. crassiceps* (Everhart et al. 2004; Willms & Zurabian 2009).

Este parasito, em seu estágio metacestóide ou cisticerco, tem sido largamente usado como modelo experimental para estudos da cisticercose murina para explorar o papel de fatores biológicos envolvendo interações parasito hospedeiro (Romano et al., 2003; Palomares et al. 2006). A utilização deste modelo experimental tem se mostrado extremamente importante na produção de antígenos utilizados em sorodiagnósticos da neurocisticercose por larva de *T. solium* pelo fato de apresentarem grande similaridade antigênica (Vaz et al. 1997; Suzuki et al. 2007) e em adição a *Taenia crassiceps* tem representado um modelo experimental confiável para avaliação *in vitro* de fármacos contra cestóides (Palomares et al. 2006). A manipulação em laboratório de *T. crassiceps*, na qual camundongos Balb/ c são excelentes hospedeiros dos cisticercos tem permitido substancial progresso no conhecimento da cisticercose (Romano et al. 2003)

Os parasitos adultos medem de 7 a 14 cm de comprimento, possuem o corpo achatado dorso ventralmente, segmentado em proglotes hermafroditas. Apresentam escólex esférico, com duas coroas de acúleos (32 a 36 por fileira) e quatro ventosas laterais (Freeman 1962; Maillard et al. 1998). Estas formas adultas habitam o terço médio do intestino dos hospedeiros definitivos, e estes eliminam proglotes grávidas repletas de ovos junto com as fezes destes mesmos hospedeiros, contaminando o ambiente. Estes ovos podem ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários, nos quais ao chegar ao trato digestório o embrião hexacanto eclode do ovo, penetra na mucosa e migra pelo organismo até órgãos ou cavidades como a região subcutânea e cavidades pleural e abdominal, bem como musculatura esquelética, sistema nervoso central e globo ocular. Nestes locais se transformam em cisticercos, ou larva metacestóide, se multiplicando por brotamentos formados a partir de sua membrana externa (Freeman 1962).

Ao se alimentarem de roedores infectados, os hospedeiros definitivos ingerem os cisticercos que passarão para fase adulta em seu sistema digestório, sendo os ovos encontrados nas suas fezes cerca de 5 a 6 semanas após a infecção e se mantendo em torno de nove meses no hospedeiro definitivo, geralmente evoluindo para a cura espontânea (Freeman 1962). A figura 1 ilustra o ciclo biológico de *T. crassiceps*.

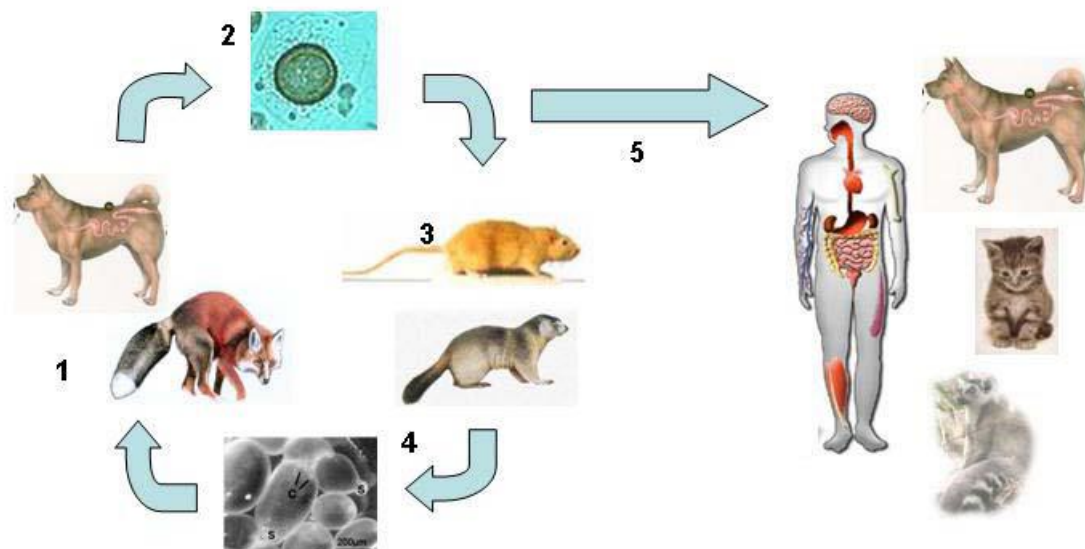


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*, (1) Hospedeiros definitivos – canídeos; (2) ovos que contaminam o ambiente (3); hospedeiros intermediários – roedores; (4) cisticercos nas cavidades dos hospedeiros intermediários (5) e hospedeiros paratênicos– mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos (descrito por Freeman 1962 e ilustrado por Vinaud 2007).

A forma larval (cisticerco) pode ser classificada segundo seu estágio evolutivo em inicial, larval e final, de acordo com suas características morfológicas (figura 2). No estágio inicial, apresenta-se translúcida e sem brotamentos; no estágio larval, apresenta-se translúcida e com brotamentos, indicando atividade reprodutiva. No estágio final, apresenta-se opaca e sem brotamentos (Vinaud et al. 2007). Mesmo apresentando o canal do escólex, muitos brotamentos não chegam a apresentar o escólex e deste modo não são capazes de produzir helmintos adultos. Algumas cepas como a ORF e WFU são capazes de produzir novos brotamentos e são mantidas experimentalmente em laboratório (Freeman 1962; Willms & Zurabian 2009).

Várias cepas de *T. crassiceps* têm sido isoladas em laboratório como a cepa ORF que embora possua o canal do escólex, não possui escólex. Outras cepas foram isoladas a partir de roedores silvestres na América do Norte (HYG, KBS, Toi, ORF e

WFU) e as cepas COLA e GIKS foram isoladas na Alemanha e Japão (Willms & Zurabian 2009).

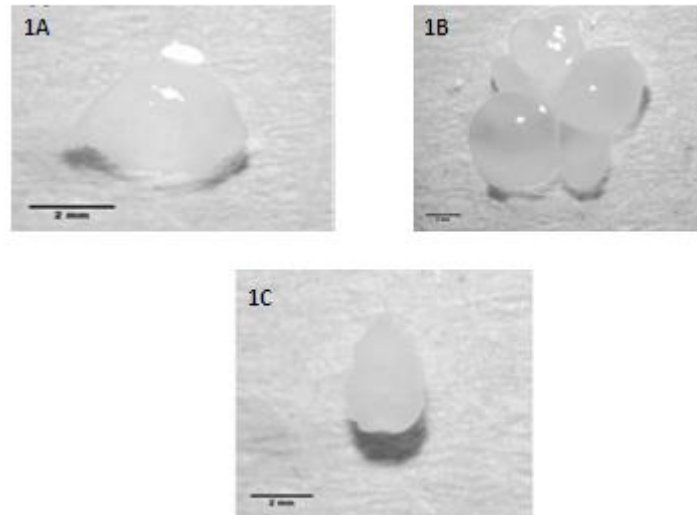


Figura 2. Características macroscópicas de cisticercos de *Taenia crassiceps*, cepa ORF, 1A. estágio inicial (vesícula translúcida e sem brotamentos), 1B. estágio larval (vesícula translúcida e com brotamentos) e 1C. estágio final (vesícula opaca e sem brotamentos). (adaptado de Vinaud et al.,2007).

A cepa ORF é extensamente utilizada em estudos experimentais os quais são conduzidos com relativa facilidade devido ao fato dos cisticercos se multiplicarem por brotamentos, permitindo sua manutenção em camundongos sem a formação de helmintos adultos (Freeman 1962; Willms & Zurabian 2009).

1.2-Epidemiologia

A infecção por *T. crassiceps* tem sido descrita principalmente na Europa, já foi encontrada em raposas vermelhas, lobos, chacais e gatos selvagens na Grécia, Itália, Alemanha e França (Freeman 1962; Everhart et al. 2004).

A cisticercose por *T. crassiceps* pode acometer animais domésticos, porém representa um evento raro, sendo descrita principalmente nos Estados Unidos e na Europa Ocidental (Chermette et al. 1993; Hoberg et al. 1999; Ballweber 2009). Entretanto, em hospedeiros imunocomprometidos pode constituir um risco zoonótico, como descrito por Hoberg (1999) onde a cisticercose por *T. crassiceps* se tornou fatal para um cão imunodebilitado.

A infecção por *T. crassiceps* em animais domésticos pelo helminto adulto promove a possibilidade de incidência em humanos (Freeman et al. 1973). Tanto os animais domésticos quanto o homem podem atuar como hospedeiros paratênicos deste parasito, desenvolvendo cisticercos no sistema nervoso central e na região subcutânea (Freeman et al. 1973).

Casos de infecção humana pela *T. crassiceps* em hospedeiros imunocompetentes já foram descritos, como o de uma garota de 15 anos que apresentou infecção ocular por cisticerco de *T. crassiceps*, todavia o parasito foi retirado sem maiores complicações (Arock-Mettinger et al. 1992). A presença de animais domésticos infectados com o helminto adulto de *T. crassiceps* aumenta a incidência de casos em humanos, como o relato de cisticercose intraocular em uma menina de 17 anos de idade que ingeriu, acidentalmente, ovos de *T. crassiceps* que estavam sendo liberados por seu cão de estimação (Freeman et al. 1973). Duong et al. (2006) relataram caso de paciente imunocompetente com presença de cisticercos sugestivos de *T. crassiceps* na parede abdominal e sem relato de doença ou caso na família de teníase por *T. solium*. A etiologia por *T. crassiceps* é sugerida devido ao provável contato do paciente com raposas provenientes da região norte da França. Também Heldwein et al. (2006) descreveram um caso na Alemanha de infecção humana por *Taenia crassiceps*, com desenvolvimento de cisticercos no tecido subcutâneo na base dos dedos na mão esquerda de um paciente com linfoma não-Hodgikin, porém a quimioterapia antiparasitária promoveu cura completa.

Outros animais domésticos como os gatos podem também atuar como hospedeiros paratênicos, desenvolvendo cisticercos no sistema nervoso central e na região subcutânea, sugerindo que a fonte da infecção pode estar próxima de humanos (Wünschmann et al. 2003).

Apesar destes relatos, em sua maioria os pacientes nos quais a infecção por *T. crassiceps* tenha sido diagnosticada apresentavam algum quadro de imunodepressão, como SIDA, tratamento com imunossupressores, quimioterapia ou linfomas (Klinker et al. 1992; Chermette et al. 1995; Maillard et al. 1998; François et al. 1998).

Embora a infecção por *T. crassiceps* seja rara em humanos e se apresente sensível ao tratamento farmacológico com anti-helmínticos em especial praziquantel e albendazol deve, assim como outras parasitoses que em muitos casos até se tornaram emergentes, ser um assunto abordado com interesse pelo fato de a imunodeficiência adquirida (HIV/SIDA) representar um alto índice de infecção na população atual e deste modo, um quadro de cisticercose por *T. crassiceps* nestes indivíduos poderia gerar quadros severos.

1.3-Metabolismo de *Taenia crassiceps*

O metabolismo de helmintos difere entre os estágios larval e adulto. Geralmente a via bioenergética encontrada em helmintos adultos é predominantemente anaeróbia, mesmo em presença de oxigênio. Os processos oxidativos terminais como o ciclo do ácido tricarboxílico e o tipo convencional de cadeia respiratória estão frequentemente ausentes ou limitados os quais impedem a utilização de ácidos graxos como fonte de energia (Komuniecki & Harris 1995).

Helmintos como *Schistosoma sp* e filarias quando se encontram em habitats com riqueza de glicose, como por exemplo vasos sanguíneos e linfáticos, excretam primariamente como produto final do metabolismo de carboidratos o lactato embora a via aeróbia possa ter a capacidade de contribuir significativamente na geração de energia. Em contraste, helmintos intestinais como o cestódeo *Hymenolepis diminuta* e o

nematódeo *Ascaris suum* que vivem em habitats com disponibilidade episódica de glicose e a tensão de oxigênio é baixa contam com estoque de glicogênio para fornecimento de energia e uma via mitocondrial capaz de gerar energia na ausência de oxigênio (Komuniecki & Harris 1995).

Os parasitos da classe Cestoda não possuem trato digestório e deste modo, tanto seu tegumento quanto sua membrana cística são adaptados à função de captação de nutrientes (Willms et al. 2005). Sua principal fonte de energia são os carboidratos, em especial a glicose (Smyth & McManus 1989). Também a trealose pode ser encontrada em helmintos. A trealose é um dissacarídeo também importante como fonte de reserva em alguns organismos como *Haemonchus contortus* e pode ser até mais abundante que o glicogênio (Komuniecki & Harris 1995).

No entanto, o comportamento metabólico do parasito depende da oferta nutricional de substâncias como carboidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, nucleosídeos, esteróis, bases púricas, porfirinas, do ambiente no qual ele se encontra. Deste modo, um metabolismo do tipo anaeróbico de degradação de carboidratos estará presente se ele estiver em um ambiente pobre em oxigênio, bem como um metabolismo aeróbico poderá ocorrer se o parasito se encontrar em ambiente no qual a oferta de oxigênio seja farta. Também em razão de serem desprovidos de trato digestório estes helmintos se tornaram capazes de incorporar nutrientes como proteínas através do tegumento por endocitose (Köhler & Voigt, 1988).

Na ausência de oxigênio a maior parte dos organismos converte glicose em moléculas orgânicas parcialmente oxidadas incluindo succinato e acetato, sendo uma estratégia fermentativa usada por organismos que vivem em meios predominantemente microaerófilos ou anaeróbios como muitos parasitos metazoários (Bringaud et al. 2010). Na sua fase adulta, *T. crassiceps* vive na cavidade intestinal do hospedeiro definitivo e como o oxigênio é escasso neste ambiente, apresenta metabolismo anaeróbico dando origem a produtos finais como acetato, ácidos graxos voláteis, succinato e lactato (Köhler & Voigt 1988; Del Arenal et al. 2001).

Através da glicólise (figura 3), as formas adultas em anaerobiose convertem a glicose em fosfoenolpiruvato, que transformado em piruvato dá origem ao lactato e alanina. O fosfoenolpiruvato poderá também originar oxaloacetato que formará malato. O malato possui trânsito livre para o interior da mitocôndria, onde é convertido em fumarato, succinato e posteriormente ao propionato. Também o malato poderá ainda ser convertido a piruvato, precursor de acetil coenzima-A, dando origem ao acetato e ácidos graxos voláteis (Köhler & Voigt 1988).

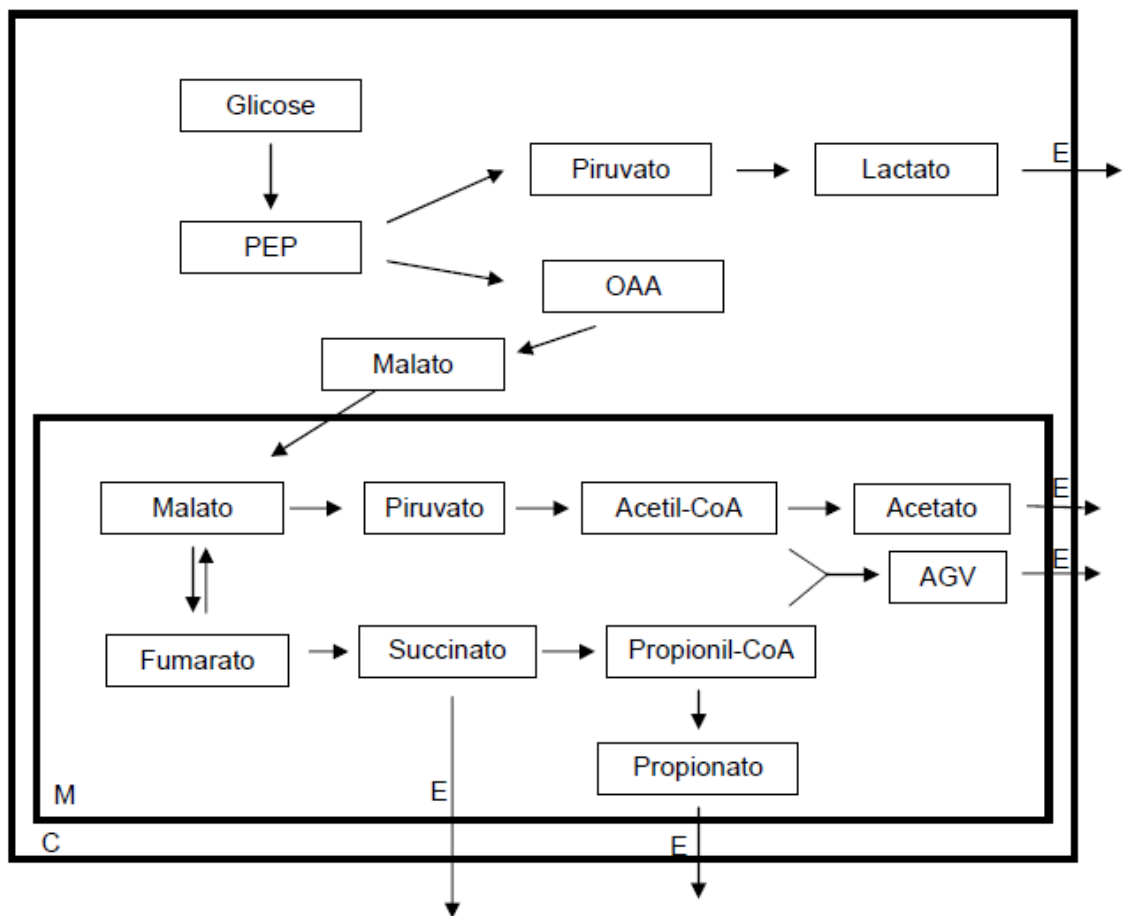


Figura 3. Catabolismo anaeróbico de carboidratos em helmintos. AGV. Ácidos graxos voláteis. C. citoplasma. E. produtos finais do metabolismo excretados. M. mitocôndria. OAA. Oxaloacetato. PEP. Fosfoenolpiruvato. Esquema adaptado de Köller e Voigt (1988) e Vinaud (2007).

A forma larval (cisticerco) vive em cavidades do hospedeiro intermediário, nas quais existem moderadas concentrações de oxigênio e desta forma os carboidratos que são utilizados como fontes energéticas são degradados pelas vias do metabolismo aeróbico (Corbin et al. 1998; Vinaud et al. 2007).

O glicogênio e a glicose são os carboidratos preferenciais utilizados como reserva e como fonte energética, respectivamente para cisticercos de *T. crassiceps* e geralmente os carboidratos são retirados do meio no qual o parasito se encontra

(Corbin et al. 1998). Entretanto outros carboidratos também são encontrados armazenados em sua membrana cística como trealose, glicosamina e galactose podendo ser usados em momentos de escassez energética (Melhorn et al. 1998; Vinaud 2007).

A figura 4 ilustra o catabolismo de carboidratos pelo cisticerco de *T. crassiceps* onde ocorre a formação de piruvato em duas regiões celulares, no citoplasma sob a ação da enzima piruvato quinase sobre o fosfoenol piruvato e na mitocôndria sob a ação da enzima málica sobre o malato. No citosol, o piruvato pode seguir três caminhos: 1. Sofre ação da enzima lactato desidrogenase, gerando lactato que poderá ser excretado ou reutilizado na gliconeogênese; 2. Sofre ação da transaminase gerando alanina, a qual será excretada; 3. É transportado para o interior da mitocôndria. Na mitocôndria, piruvato é convertido em acetil-co-A gerando citrato, que participará do ciclo do ácido cítrico, ou acetato que será excretado. Também pode sofrer ação da enzima málica mitocondrial formando malato e invertendo parcialmente o ciclo do ácido cítrico (Corbin et al. 1998; Vinaud et al. 2007). *In vitro*, produtos finais do metabolismo de carboidratos de *Taenia crassiceps* são lactato e alanina e do metabolismo respiratório são acetato, citrato e succinato. (Corbin et al. 1998; Vinaud et al. 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que em condições de estresse metabólico os cisticercos de *T. crassiceps* são capazes de oxidar ácidos graxos como fonte alternativa de energia, gerando β -hidroxibutirato, propionato e acetato os quais são excretados (Vinaud et al. 2009; Fraga et al. 2011).

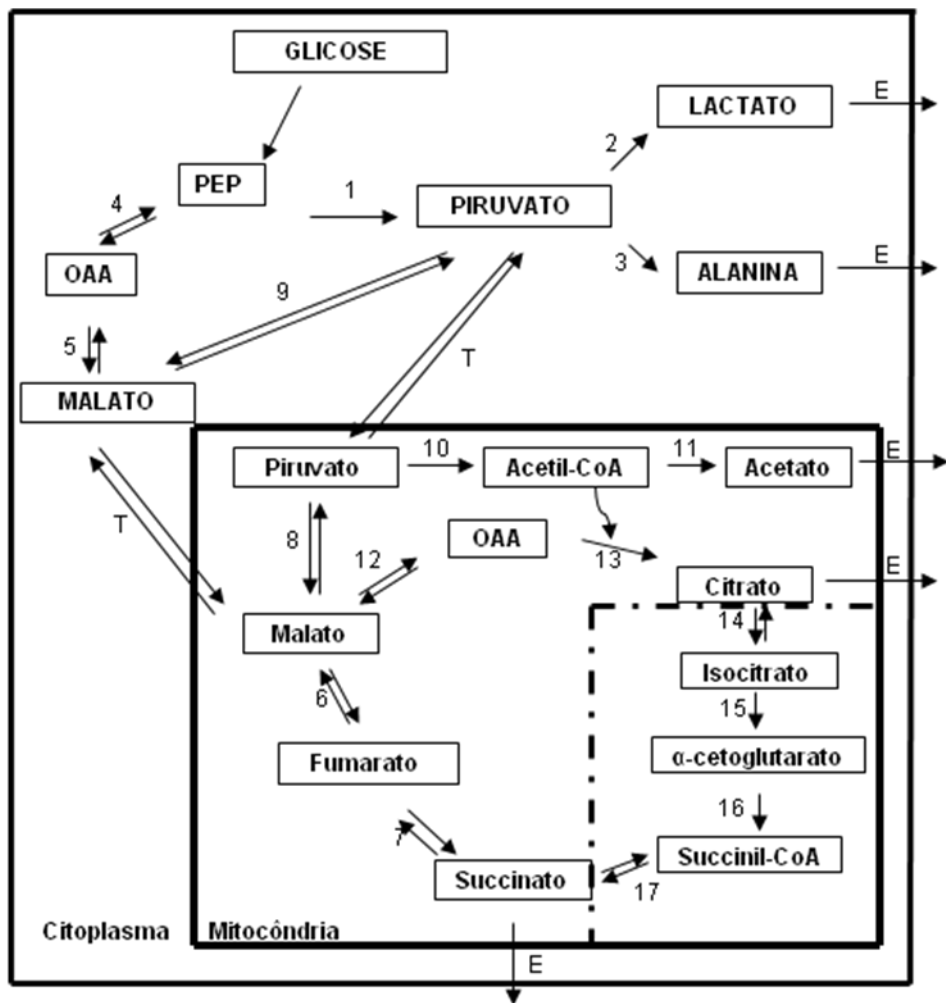


Figura 4- Catabolismo de carboidratos em cisticercos de *Taenia crassiceps* e produtos finais do metabolismo excretados. PEP. Fosfoenolpiruvato. OAA. Oxaloacetato. T. Substâncias com trânsito livre pela membrana mitocondrial. 1. Piruvato quinase; 2. Lactato desidrogenase; 3. Alanina transaminase; 4. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 5. Malatodesidrogenase citosólica; 6. Fumarase; 7. Fumaratoredutase; 8. Enzima málica mitocondrial; 9. Enzima málica citosólica; 10. Complexo da 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. Reações mitocondriais separadas pelo pontilhado que ocorrem em vertebrados não foram demonstradas em cestódeos. Adaptado de Corbin et al. (1998) Melhorn et al (1998) e Vinaud (2007).

No metabolismo de invertebrados, o succinato é um ácido orgânico excretado como produto final do ciclo do ácido cítrico que também pode ser utilizado via succinato desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons na fase do complexo II da cadeia respiratória, indicando que sua concentração está diretamente relacionada aos processos respiratórios aeróbios (Komuniecki & Harris 1995).

O modo como os helmintos realizam a biossíntese de aminoácidos e proteínas, permanece desconhecida, mas aparentemente ocorre uma retirada destes elementos do ambiente de acordo com a biodisponibilidade oferecida pelo hospedeiro. Esses aminoácidos podem ser utilizados na síntese de proteínas, neurotransmissores e neuro-hormônios (Köhler & Voigt 1988). Da mesma forma, processos como catabolismo de proteínas também não estão claros em helmintos, admitindo-se a produção e excreção de amônia como produto final e não uréia, como ocorre na maioria dos vertebrados (Köhler e Voigt, 1988). Não foi encontrada na literatura a descrição do ciclo da uréia em cestóides. Porém, em mamíferos ocorre o catabolismo de aminoácidos dentro e fora da mitocôndria, gerando fumarato e uréia como produtos finais, que serão excretados (Lehninger et al., 2011).

A maioria dos helmintos não é capaz de sintetizar lipídios (ácidos graxos de cadeias longas e esteróis), sendo, portanto, dependentes de sua absorção a partir do meio no qual se encontram. Ácidos graxos absorvidos de fontes exógenas são rapidamente incorporados nas reservas de triacilglicerol e fosfolipídeos, encontrados principalmente na membrana cística e tegumento de cestódeos (Köhler e Voigt, 1988).

1.4-Fármacos anti-helmínticos utilizados no tratamento da cisticercose

O albendazol e o praziquantel, preferencialmente utilizados em conjunto e associados com medicação atinflatória e imunossupressora, representam na atualidade os fármacos de escolha para tratamento da cisticercose (Palomares et al. 2006; Chávez-Trejo et al. 2011).

O albendazol tem sido mais efetivo que o praziquantel, representando na atualidade o fármaco preferido para o tratamento da cisticercose, entretanto, quando não apropriado ou disponível, o praziquantel apresenta eficácia semelhante (Rosenthal & Goldsmith 2005; Palomares et al. 2006; Chávez-Trejo et al. 2011). O albendazol é considerado um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro e relativamente bem tolerado (Kölher 2001).

O albendazol é um carbamato benzimidazol. Após administração oral depois de absorvido sofre rápido metabolismo de primeira passagem no fígado ao metabólito ativo o sulfóxido de albendazol. Atinge concentrações plasmáticas máximas variáveis cerca de 3 horas após administração de uma dose oral de 400 mg e apresenta meia vida plasmática de 8-12 horas (Rosenthal & Goldsmith 2005).

Em humanos, o albendazol é um fármaco que é capaz de induzir atividade das enzimas do CYP-450 responsáveis pela metabolização hepática convertendo-o em sua forma ativa: albendazol sulfóxido (Venkatesan 1998).

Os fármacos anti-helmínticos do grupo dos benzimidazólicos como o albendazol e o mebendazol são capazes de provocar alterações na ultraestrutura das células intestinais de nematódeos e, em cestódeos, nas células de seu tegumento especialmente atuando na redistribuição de vesículas citoplasmáticas e organelas. O albendazol promove modificações bioquímicas no parasito atuando na enzima fumarato redutase, interferindo na respiração celular do cisticerco (Kölher 2001). Atua na polimerização da β -tubulina provocando interrupção na formação dos microtúbulos e

afetando o metabolismo celular do parasito ao inibir a captação de glicose e desse modo interferindo na sua nutrição levando o mesmo um colapso por falta de energia (Venkatesan 1998; Rosenthal & Goldsmith 2005; Palomares et al. 2006; Chávez-Trejo et al. 2011).

O albendazol também exerce efeitos larvicidas na doença hidática, na ascaridíase e na ancilostomíase, bem como efeitos ovicidas na ascaridíase, ancilostomíase e tricuriase (Rosenthal & Goldsmith 2005; Rang & Dale 2012). Dessa forma, o albendazol demonstra ser eficaz contra as principais formas de nematódeos intestinais e cestódeos atuando contra as formas adultas, larvais e ovos (Venkatesan 1998; Horton 2000; Rang & Dale 2012).

A administração conjunta de praziquantel e albendazol tem sido sugerida com a finalidade de aumentar a efetividade no tratamento contra trematódeos e cestódeos e ainda é sugerido que o praziquantel aumenta a metabolização do albendazol e consequentemente promove elevação da concentração plasmática do albendazol sulfóxido, metabólito ativo da droga (Bóia 2006).

O praziquantel é considerado como fármaco muito eficaz para tratamento tanto de trematódeos quanto de cestódeos tanto em humanos quanto em animais (Chermette et al. 1995; Maillard et al. 1998; Cioli et al. 2002; Rosenthal & Goldsmith 2005). Consiste em um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro em associação a um relativo custo baixo e boa tolerabilidade. Entretanto, alguns efeitos colaterais são observados em cerca de 60% dos pacientes incluindo náuseas, anorexia, vômitos, diarreia, porém estes sintomas geralmente são transitórios e desaparecem em torno de 24 horas (Cioli et al. 2002).

O praziquantel é um derivado sintético da isoquinolina-pirazina. Sofre rápida absorção, com biodisponibilidade de cerca de 80% após administração oral e as concentrações séricas máximas são alcançadas dentro de 1-3 horas após uma dose terapêutica. As concentrações de praziquantel no líquido cefalorraquidiano atingem 14-20% das concentrações plasmáticas do fármaco. Cerca de 80% do fármaco liga-se às

proteínas plasmáticas e suas concentrações plasmáticas aumentam quando administrado com uma refeição rica em carboidratos ou com administração conjunta de cimetidina (Rosental & Goldsmith 2005).

No gênero *Schistosoma* o praziquantel age promovendo contração muscular e posteriormente imobilização do parasito, devido ao influxo de cálcio, levando a sua morte. Também age causando danos em seu tegumento e alterações metabólicas. A larva ou cisticerco de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*) especialmente quando em sua localização no cérebro (neurocisticercose) pode ser tratada com altas doses de praziquantel (50mg/Kg/dia por 15 dias) geralmente em associação com corticoesteróides e cimetidina os quais potencializam suas concentrações plasmáticas (Cioli et al. 1995).

Palomares et al. (2006) descreveram que em ensaios *in vitro* o praziquantel sozinho ou associado ao albendazol causa danos nas fibras musculares de cisticercos de *T. crassiceps*, causando alterações na motilidade do parasito e promovendo espasmos musculares e vacuolização citoplasmática, inclusive perda de integridade celular. Bioquimicamente, estudos *in vitro* demonstraram indução da via mitocondrial de utilização do piruvato (Vinaud et al. 2008) e *in vivo*, uma diminuição na produção de fumarato e malato e aumento na produção de succinato, estimulando a via aeróbia de produção de energia (Fraga 2011).

O praziquantel age sobre platelmintos promovendo alterações no influxo de cálcio relacionadas a presença do fármaco, indicando que os canais de cálcio de *Schistosoma sp* são sensíveis ao fármaco, enquanto que os canais de cálcio encontrados em mamíferos não apresentam tal sensibilidade, este fato explica a seletividade de ação do fármaco somente no parasito. Além disso, o fármaco é capaz de alterar a estrutura da bicamada de fosfolípidos de membrana ou a fluidez da membrana celular do parasito, o que poderia resultar em alterações na permeabilidade de membrana ao cálcio ou a efeitos indiretos em receptores e canais de membrana (Greenberg 2005).

1.5-Glicose

A glicose é o principal combustível da maioria dos organismos e ocupa uma posição central no metabolismo e através de seu armazenamento como um polímero de massa molecular alta, a célula pode acumular grandes quantidades de hexose, enquanto mantém uma osmolaridade citosólica relativamente baixa. Desse modo, quando demandas energéticas aumentam subitamente, a glicose pode ser liberada rapidamente desses polímeros de armazenamento intracelulares e empregada para produzir ATP de maneira aeróbica ou anaeróbica (Lehninger et al., 2011).

Na ausência de oxigênio, as células de mamíferos obtêm energia pela glicólise ou fermentação, entretanto a maioria das células eucarióticas vivendo em condições aeróbicas e oxidando seus combustíveis orgânicos completamente até dióxido de carbono e água, a glicólise não é mais que o primeiro estágio da oxidação completa da glicose e então o piruvato formado na via glicolítica ao invés de reduzido a lactato ou outro produto da fermentação é sim oxidado a CO_2 e H_2O . Essa fase aeróbica do catabolismo é chamada respiração (Lehninger et al., 2011).

A glicólise é a principal via do metabolismo da glicose, ocorrendo no citosol de todas as células. A capacidade da glicólise de produzir ATP na falta de oxigênio permite que o músculo esquelético de mamíferos trabalhe em níveis elevados mesmo na falta de oxigênio. A concentração de glicose na corrente sanguínea de mamíferos é mantida a níveis sensivelmente constantes. A glicose entra nas células por difusão facilitada por carreador/transportador. Este processo não permite a acumulação na célula de concentrações de glicose superiores às existentes no sangue, conseqüentemente para manter glicose em seu interior é realizada modificação química da glicose pela enzima hexoquinase (Murray et al. 2013; Lehninger et al. 2011).

Em mamíferos a glicólise inicialmente ocorre com a conversão da glicose em glicose-6-fosfato por ação da hexoquinase. A membrana celular é impermeável à glicose-6-fosfato, que pode por isso ser acumulada na célula. A glicose-6-fosfato será

utilizada na síntese do glicogênio (uma forma de armazenamento de glicose), para produzir outros compostos de carbono na via das pentoses fosfato, ou degradada para produzir energia (glicólise). Para poder ser utilizada na produção de energia, a glicose-6-fosfato é primeiramente isomerizada a frutose-6-fosfato pela fosfoglicose isomerase. A frutose-6-fosfato é depois fosforilada a frutose-1,6-bisfosfato pela ação da fosfofrutoquinase. Este é o ponto de não retorno desta via metabólica: a partir do momento em que a glicose é transformada em frutose-1,6-bisfosfato não pode ser usada em nenhuma outra via. Então a frutose-1,6-bisfosfato é clivada em dois açúcares de três carbonos cada (dihidroxiacetona fosfatada e gliceraldeído-3-fosfato). A dihidroxiacetona é isomerizada em uma segunda molécula de gliceraldeído 3-fosfato, ocorrendo após a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato e finalizando a primeira etapa da glicólise (Lehninger et al. 2011).

Na segunda fase da glicólise as duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato são fosforiladas por fosfato inorgânico para formar duas moléculas de 1-3-fosfoglicerato e posteriormente duas moléculas de piruvato (Murray et al. 2013; Lehninger et al. 2011).

A regulação da glicólise ocorre pela enzima hexoquinase inibida pelo próprio produto Glicose-6-fosfato; a fosfofrutoquinase é a principal enzima no controle da via glicolítica, também altos níveis de ATP e citrato exercem inibição (Murray et al 2013).

O piruvato produzido na glicólise ainda contém bastante poder redutor. Este poder redutor vai ser aproveitado pela célula no Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Cítrico, ocorrendo no interior mitocondrial. Em primeiro lugar, o piruvato é utilizado para produzir acetil-CoA, que é uma forma ativada de acetato. Nesta reação intervém a piruvato desidrogenase (Murray et al. 2013).

Na primeira reação do ciclo de Krebs, o acetil-CoA é adicionado a oxaloacetato, dando origem a citrato que depois é isomerizado a isocitrato. Este é então descarboxilado a α -cetoglutarato. A parte final do ciclo de Krebs consiste em regenerar o oxaloacetato a partir do succinato. O succinato é primeiro oxidado a fumarato, pelo complexo succinato desidrogenase, que se encontra na face matricial da membrana

interna da mitocôndria. A hidratação do fumarato produz malato, que depois é oxidado a oxaloacetato, completando o ciclo. Uma seqüência semelhante de reações ocorre na β -oxidação dos lipídeos (Murray et al 2013).

1.6-Insulina

Em mamíferos, o controle do nível glicêmico é realizado pela insulina juntamente com outros hormônios como o glucagon. A insulina é liberada nos períodos pós-prandiais e faz com que os músculos e células adiposas absorvam glicose e promove a diminuição de fabricação de glicose no fígado (Rang & Dale 2012). É secretada pelas células β pancreáticas e foi proposta como uma substância hipotética relacionada em mamíferos com a secreção do pâncreas e cerca de uma década depois, a partir de investigações atribuídas a Banting & Best (1922), na qual utilizavam extrato deste órgão em animais previamente pancreatomizados o hormônio foi reconhecido como grande responsável pelo controle da glicose sanguínea. O termo insulina (Latin: insula, ilha) define sua profunda relação com as ilhotas de Langerhans (Rosenfeld 2002).

O pâncreas endócrino humano é constituído por cerca de 1 milhão de ilhotas de Langerhans, distribuídas por todo órgão (Katzung 2009). As ilhotas de Langerhans possuem quatro tipos de células secretoras de hormônios, as denominadas β ou B secretam insulina, as células A ou α o glucagon, as D somatostatina e as PP o peptídeo pancreático, cuja função é desconhecida (Rang & Dale 2012). As células B representam 60 a 80% da ilhota, formando um núcleo central (Davis 2005) que além da insulina, secretam um peptídeo conhecido como polipeptídeo amilóide das ilhotas ou amilina, que retarda o esvaziamento gástrico e se opõe a insulina por estimulação da degradação de glicogênio no músculo estriado (Rang & Dale 2012).

A insulina possui peso molecular de cerca de 5734 Daltons, contém 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias A e B unidas por pontes dissulfeto; entre as espécies humanas, bovinos, suínos existem diferenças nos aminoácidos de ambas as

cadeias. A bovina difere do hormônio humano em três aminoácidos, enquanto somente um aminoácido diferencia a suína da humana (Katzung 2009).

Como outros hormônios peptídicos, a insulina é sintetizada na forma de um precursor (pré-pró-insulina) no retículo endoplasmático granuloso, este precursor é então transportado ao aparelho de Golgi, onde sofre clivagem proteolítica, primeiramente, a pró-insulina e, depois, a insulina e um fragmento de função incerta chamado peptídeo C. Após, ambos são armazenados nas células B sendo secretados por exocitose em quantidades equimolares, juntamente com quantidades menores e variáveis de pró-insulina (Murray et al. 2013).

O principal fator de controle na síntese e produção da insulina é a glicemia, entretanto existem outros fatores que são aminoácidos, ácidos graxos, divisão parassimpática do sistema nervoso, hormônios peptídicos para o intestino e fármacos que atuam sobre os receptores de sulfoniluréia (Rang & Dale 2012).

No fígado, a insulina inibe a glicogenólise (degradação do glicogênio) e a gliconeogênese (síntese de glicogênio a partir de fontes que não sejam carboidratos), enquanto estimula a síntese de glicogênio a partir de carboidratos. Também aumenta a glicólise e aumenta os depósitos hepáticos de glicogênio (Murray et al. 2013). A insulina aumenta a captação da glicose pelas células hepáticas em vertebrados pelo aumento da enzima glicoquinase que causa fosforilação inicial da glicose e uma vez difundida nas células hepáticas não pode ser difundida de volta pela membrana celular (Lehninger et al. 2011). Sobre o metabolismo das gorduras aumenta a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos no tecido adiposo e no fígado, inibe a lipólise por desfosforilação das lipases aumentando a síntese de glicerol, e, conseqüentemente aumenta a síntese de triglicérides e de ácidos graxos. Em relação às proteínas estimula a captação de aminoácidos pelo músculo e aumenta a síntese de proteínas, também diminui o catabolismo de proteínas e inibe a oxidação de aminoácidos no fígado. A insulina também está implicada na replicação celular, visto que estimula proliferação de diversos tipos celulares em cultura podendo também estar envolvida com regulação *in vivo* do

crescimento. Fibroblastos em cultura são as células mais comumente utilizadas em estudos a respeito do controle do crescimento (Murray et al. 2013).

O pâncreas humano secreta diariamente 40-50 unidades de insulina, que representa cerca de 15-20% do hormônio armazenado na glândula. Os mediadores implicados nesta liberação são a glicose, fatores hormonais e agentes farmacológicos (Murray et al. 2013). Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) determinam o potencial de membrana de repouso nas células B pancreáticas. A glicose entra nas células B através de um transportador de membrana e seu metabolismo subsequente, através da glicoquinase (a enzima limitante que atua como “sensor de glicose”, ligando a secreção de insulina à glicose extracelular) e da glicólise, aumenta o ATP intracelular. Isto bloqueia os canais K_{ATP} , causando despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, levando ao influxo de Ca^{2+} . O aumento de Ca^{2+} citoplasmático resultante desencadeia secreção de insulina, mas somente na presença de mensageiros amplificadores, incluindo o diacilglicerol, o ácido araquidônico não-esterificado, que facilita ainda mais a entrada de Ca^{2+} e produtos da 12-lipoxigenase do ácido araquidônico (Rang & Dale 2012).

1.7-Transporte celular de glicose

O transporte de glicose para o interior das células adiposas, musculares cardíacas e esqueléticas é pronunciadamente aumentado pela insulina. Isto ocorre através do recrutamento de transportadores de glicose a partir de uma reserva intracelular inativa e, a seguir, pela mobilização dos mesmos a um sítio ativo na membrana plasmática (Murray et al. 2013).

A glicose e outros açúcares de configuração similar penetram na célula por difusão facilitada mediada por carregador, através de um transportador de glicose (Katzung 2009; Murray et al. 2013). A célula hepática apresenta uma exceção a este esquema visto que a insulina não promove difusão facilitada para o interior dos hepatócitos, mas aumenta indiretamente seu fluxo ao promover a conversão de glicose

intracelular em glicose-6-fosfato através da ação da glicoquinase que é uma enzima induzida pela insulina. Esta rápida fosforilação mantém a concentração de glicose livre muito baixa no hepatócito, favorecendo, portanto, a entrada por difusão simples através de gradiente de concentração (Murray et al. 2013).

O transporte passivo mediado por transportador exibe uma cinética de saturação do transportador, dependendo do gradiente de concentração externo e interno. Quando as concentrações interna e externa se igualam, a absorção celular de glicose diminui (Murray et al. 2013).

Doze transportadores de glicose estão codificados no genoma humano, cada um com suas propriedades cinéticas únicas, padrões de distribuição no tecido e função (Lehninger et al. 2011). Os mais conhecidos são o GLUT-1 que é ubíquo e o principal transportador no cérebro, o GLUT-2 localiza-se em especial no fígado e é funcionalmente associado à glicoquinase. O GLUT-3 no cérebro, rim placenta, o GLUT-4 localiza-se no músculo cardíaco e esquelético e no tecido adiposo e o GLUT-5 nos intestinos (Katzung 2009; Murray et al. 2013).

1.8-Receptor de insulina

A ação da insulina se inicia quando o hormônio se liga a um receptor glicoproteico específico de superfície da célula-alvo. As diversas ações do hormônio podem ocorrer em segundos ou minutos (transporte, fosforilação protéica, ativação e inibição enzimáticas, síntese de RNA) bem como após algumas poucas horas (sínteses protéicas de DNA, crescimento celular) (Murray et al. 2013).

Após penetrar na circulação, a insulina liga-se a receptores especializados presentes nas membranas da maioria dos tecidos em mamíferos. O receptor da insulina consiste em uma glicoproteína composta de duas subunidades: alfa (α) beta (β), unidas por duas pontes dissulfeto. A subunidade alfa é externa à célula e a beta se comporta como uma proteína transmembrana que possui atividade de tirosina quinase e quando a insulina se liga com a subunidade alfa promove auto-fosforilação cruzada da

subunidade beta, induzindo sua atividade de tirosina quinase e resultando em uma cascata de fosforilação. A concentração intracelular de glicose livre é muito baixa quando comparada com a concentração extracelular. A taxa de transporte de glicose através das membranas plasmáticas de células musculares e adiposas determina a taxa de fosforilação da glicose e seu consequente metabolismo quando os níveis de ambos (glicose e insulina) são normais. Quando a glicose ou insulina estão elevadas, como após uma refeição, a fosforilação se torna limitante (Murray et al. 2013).

Quando a insulina se liga ao seu receptor específico na célula, ocorrem diversos eventos (1) existe uma alteração conformacional dos receptores; (2) estes realizam ligações-cruzadas e formam micro-agregados; (3) o receptor é internalizado e (4) um ou mais sinais são gerados. Em condições nas quais os níveis plasmáticos de insulina se encontram elevados como na obesidade ou acromegalia, por exemplo, o número de receptores para insulina está diminuído e os tecidos-alvos se tornam menos sensíveis à insulina, isso explica em parte a resistência à insulina na obesidade e diabetes mellitus tipo II (Murray et al. 2013).

1.9-Tipos de insulinas comerciais

O Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 é uma doença autoimune na qual as células β ou B pancreáticas são destruídas pelo sistema imune e que usualmente ocorre na infância ou adolescência ocasionando problemas no controle efetuado pela insulina. Esta enfermidade ocasiona alterações no metabolismo glicídico, lipídico e proteico. Existem quatro tipos de DM tipo 1, 2, 3 e 4. O primeiro é resultante da não secreção de insulina pelo pâncreas e o segundo, não insulino dependente, não é diretamente ligado à secreção, mas a fatores como, por exemplo, resistência à insulina, onde o tratamento é realizado, principalmente, sem a utilização desse hormônio, no tipo 3 as causas são múltiplas como farmacológicas por exemplo e o tipo 4 é o diabetes gestacional (Katzung 2009; Zacone & Cooke 2013).

Desse modo, a insulina é essencial para o tratamento do diabetes tipo I e então a busca de uma insulina mais próxima à fisiológica fez com que surgissem as insulinas de curta e longa duração, por modificações na estrutura proteica (Rang & Dale 2012). O tratamento visa promover o equilíbrio da glicose sanguínea e evitar complicações a longo prazo (Rang & Dale 2012). O tratamento crônico utiliza a injeção subcutânea do hormônio visando repor a insulina em jejum, entre as refeições e pós prandial (Katzung 2009).

De modo geral as insulinas comerciais atuais se classificam quanto ao tempo de ação em ultra-rápida (lispro, glulisina e aspártica), rápida ou curta (regular), intermediária (NPH) e ação longa (Detemir e Glargina) e, quanto à origem, em regular que é idêntica a humana e NPH também idêntica a humana, porém associada a protamina e zinco para prolongar seu efeito (produzidas por técnicas de engenharia genética), insulinas análogas a humana (forma alterada da molécula a partir da insulina humana), também produzidas por técnicas do DNA recombinante ou insulina animal (suína, bovina ou mista). As insulinas de origem animal consistiam no tratamento padrão para o diabetes mellitus até que a insulina humana passou a ser produzida por tecnologia de DNA recombinante (Davis 2005; Murray et al. 2013).

Ação	Tipo de Insulina	Início	Pico de ação	Duração efetiva	Duração máxima
Ultra-Rápida	Lispro	< 15 min	0,5-1,5 h	2-4 h	4-6 h
	Glulisina	5-10min	30-90min	±5h	ND
	Aspart	5-10 min	1-3 h	3-5 h	4-6 h
Rápida	Regular	0,5-1 h	2-3 h	3-6 h	6-10 h
Intermediária	NPH	2-4 h	4-10 h	10-16 h	14-18 h
Longa	Detemir	2 h	Dose dependente	Dose dependente	Dose dependente
	Glargina	2 h	Não tem	24 h	24 h

Figura 5- Classificação das insulinas em ação rápida, ultra rápida, intermediária e longa (Rang & Dale 2012).

A insulina glargina, registrada no Brasil sob o nome comercial de LANTUS® é produzida pelo laboratório Sanofi-Aventis e consiste em um análogo solúvel de insulina humana de ação ultralonga “sem pico” (com amplo platô de concentração plasmática). A fixação de duas moléculas de arginina à extremidade carboxi-terminal da cadeia B e a substituição da asparagina por glicina na porção A21 criaram um análogo que é solúvel em solução ácida, mas que precipita no pH mais neutro do corpo após injeção subcutânea, liberando continuamente pequenas quantidades, permitindo uma única aplicação ao dia (ANVISA 2010). Segundo a bula do fabricante Sanofi-Aventis as moléculas individuais de insulina dissolvem-se lentamente do depósito cristalino e produzem baixos níveis constantes de insulina circulante. Seu início de ação é lento de 1-1,5 hora e é mantida até 24 horas ou mais.

A figura 6 mostra os picos de ação das insulinas comerciais atualmente disponíveis mais comumente utilizadas no tratamento de pacientes diabéticos.

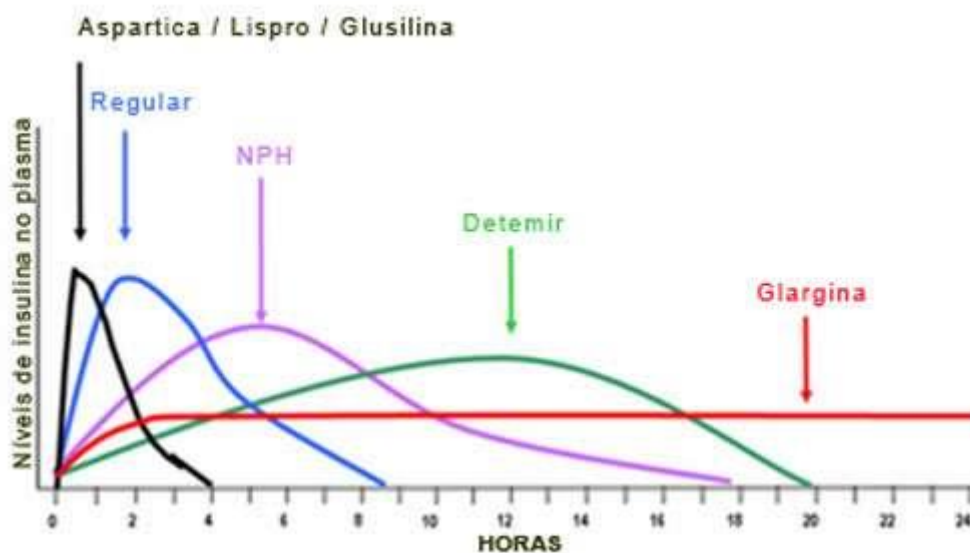


Figura 6 - Perfis de ação de insulinas atualmente disponíveis (<http://www.anad.org.br/institucional/tipos.asp>).

A insulina integra a categoria de medicamentos biológicos segundo a Resolução de Diretoria Colegiada– RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005, que é o regulamento técnico de registro, alterações pós–registro e revalidação de registro dos produtos biológicos terminados. Para essa Resolução, os medicamentos incluídos nessa categoria são: as vacinas, os soros hiperimunes, hemoderivados, biomedicamentos (obtidos por procedimentos ou a partir de fluídos biológicos ou de tecidos de origem animal), anticorpos monoclonais, probióticos, alérgenos e os com microorganismos vivos atenuados ou mortos (BRASIL-ANVISA 2005).

1.10- Influência da glicose e da insulina sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*

A glicose é o carboidrato utilizado como principal fonte energética pelos cisticercos de *T. crassiceps* e geralmente é retirada do meio no qual o parasito se encontra (Melhorn et al. 1988). Apresenta um nível alto de energia potencial, tornando-a bom combustível para as reações que ocorrem no ambiente intracelular e pode ser armazenada em formas poliméricas de elevado peso molecular como o glicogênio que em situações de emergência energética, vai ser libertada desta forma armazenada e ficando disponível para entrar em processos de oxidação com extração de ATP (Komuniecki et al. 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que a presença da glicose cria condições favoráveis ao desenvolvimento de cisticercos de *T. crassiceps* (Escobedo et al. 2009) devido a alta oferta energética, visto que a formação de brotamentos requer considerável gasto de energia.

A insulina promove entrada de glicose para células de mamíferos através de ligação com receptores específicos presentes nas membranas celulares e desse modo, ativando e translocando os transportadores de glicose (Lehninger 2011). Em invertebrados estudos já demonstraram presença de receptores de insulina análogos

aos presentes em mamíferos com funções semelhantes ou iguais as apresentadas nos mamíferos (Escobedo et al. 2009).

Muitos exemplos de interações endócrinas recíprocas entre parasitas e hospedeiros tem sido encontrados em insetos, artrópodes e mamíferos (Romano et al. 2003) e neste aspecto, receptores de superfície específicos para o hormônio insulina tem sido descrito também numa larga variedade de invertebrados, incluindo o mais primitivo filo dos metazoários (cnidários e espongiários) e seu papel central é atuar na divisão e diferenciação celular (Escobedo et al. 2009; Ostoa-Saloma et al. 2010). Já foi descrito em muitas espécies de Taenídeos estruturas similares aos receptores de hormônios expressos por vertebrados, com propriedades semelhantes aos receptores do hospedeiro frente aos metabólitos hormonais (Escobedo et al. 2009). Estudos demonstraram que ambos os cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* possuem habilidade para sintetizar vários hormônios sexuais esteroides como androstenediona e testosterona utilizando diferentes precursores hormonais, sugerindo que possuem maquinaria enzimática para transformar estes precursores esteroides em metabólitos (Jiménes et al. 2006). Outros estudos realizados por Romano et al. (2003) relacionados com produção de hormônios, demonstraram produção de androgênios por cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* em camundongos machos e fêmeas Balb/c.

Estudos feitos por Escobedo et al. (2009) descreveram *in vitro* a detecção de receptores de insulina em cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* e Ostoa-Saloma et al. (2010) demonstraram *in vitro* que cisticercos de *T. crassiceps* tiveram sua reprodução aumentada quando expostos ao hormônio insulina em relação a um grupo controle.

2- JUSTIFICATIVA

Neste estudo foi analisado, através de cultivo *in vitro*, o metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* expostos à glicose, insulina e aos fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel em baixas doses.

A glicose e o glicogênio, a forma polimerizada da glicose, representam a maior fonte de energia para os cestódeos. O glicogênio encontra-se estocado em grande quantidade nas membranas do parasito e a glicose geralmente é obtida do hospedeiro, no meio no qual o parasito se encontra (Willms et al. 2005; Vinaud et al. 2008). Os fármacos anti-helmínticos disponíveis utilizados atualmente em infecções por cestódeos agem alterando o metabolismo destes parasitos em relação a estes carboidratos.

Estudos demonstraram que os fármacos anti-helmínticos albendazol e o praziquantel são capazes de alterar o metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* bloqueando sua captação de glicose e, deste modo, forçando o parasito a criar fontes alternativas de energia para sobreviver ou consumir suas reservas (Vinaud et al. 2008).

Também já foi descrito que alguns hormônios como a insulina podem desempenhar papel ativo na cisticercose murina por *T. crassiceps*. Camundongos fêmeas Balb/c normais infectadas com cisticercos de *T. crassiceps* previamente expostos à insulina, apresentaram aumento significativo na carga parasitária em relação aos camundongos inoculados com cisticercos não expostos à insulina (Escobedo et al. 2009).

Escobedo et al. (2009), demonstraram que cisticercos de *T. crassiceps* (cepa ORF) expressam receptores para insulina semelhantes aos expressos por células humanas, fato que demonstra a facilidade do parasito em absorver a glicose do hospedeiro.

A insulina é um hormônio responsável em humanos principalmente por promover entrada de glicose nas células, promovendo a redução dos seus níveis sanguíneos (Murray et al. 2013). Escobedo et al. (2009) demonstraram *in vitro* que a insulina parece promover reprodução, crescimento e viabilidade em cisticercos de *T. crassiceps*, contribuindo para a proliferação celular deste parasito.

Estudos demonstraram diferenças metabólicas encontradas em cisticercos nos seus diferentes estádios evolutivos, indicando que a produção de brotamentos exige uma demanda maior de energia, inclusive de fontes energéticas alternativas, retiradas do hospedeiro, debilitando seu habitat já que cisticercos em fase inicial e larval são encontrados em grande quantidade na cavidade peritoneal (Dorais & Esch, 1969).

Devido ao emprego de cisticercos de *T. crassiceps* como modelo experimental para estudos de cisticercose causada pela forma larval de *T. solium* e diante do fato que a infecção por *T. crassiceps* pode também atingir humanos em especial em estado de debilidade do sistema imune como ocorre na infecção pelo HIV, podendo levar a quadros graves e muitas vezes de difícil diagnóstico, estudos mais aprofundados do comportamento metabólico deste parasito se tornam de real importância (Klinker et al. 1992; Maillard et al. 1998; Duong et al. 2006, Heldwein et al. 2006).

Estudos metabólicos *in vitro* são necessários para determinar os mecanismos de sobrevivência dos parasitos frente a ambientes diversos e por vezes hostis possibilitando obtenção de resultados que podem auxiliar estudos futuros a este respeito. Maiores conhecimentos a cerca da complexa interação que ocorre na relação parasito/hospedeiro são o ponto chave para compreensão do sucesso do parasito em sua jornada dentro do hospedeiro e para possibilitar caminhos para controle da infecção.

3- OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Objetivo geral

- Analisar *in vitro* o metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* expostos à glicose, insulina e baixas doses de fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel.

2-Objetivos específicos

- Determinar e quantificar *in vitro* o efeito de duas concentrações de glicose no metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps*.
 - Determinar *in vitro* o efeito de duas concentrações de insulina no metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps*.
 - Quantificar *in vitro* a influência dos fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel, em baixas doses no metabolismo de vias respiratórias e energéticas de cisticercos de *T. crassiceps*.
 - Determinar a influência de duas concentrações de glicose e de insulina no mecanismo de ação dos fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel em cisticercos de *T. crassiceps*.
-

4- METODOLOGIA

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

O ciclo biológico de *T. crassiceps* (cepa ORF) foi mantido no biotério do IPTSP/UFG a partir da forma larval de *T. crassiceps* que foi inicialmente inoculada na cavidade peritoneal de camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade. Estes cisticercos multiplicaram por brotamento e cerca de 60 a 90 dias após a infecção os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, obedecendo ao protocolo de necropsia preconizado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e os cisticercos foram retirados de sua cavidade peritoneal. Os cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial retirados dos camundongos infectados foram inoculados em camundongos fêmeas BALB/c, em número de aproximadamente 10 cisticercos por animal, para dar continuidade ao ciclo (Vaz et al. 1997).

Os animais foram devidamente alojados com luminosidade e temperatura controlados, bem como umidade relativa do ar e ruídos, recebendo cuidados diários, água acidificada e ração padrão para a espécie à vontade.

4.2-Cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizados no cultivo

Após aproximadamente quatro semanas de infecção, camundongos fêmeas BALB/c infectadas com cisticercos de *T. crassiceps* (cepa ORF) que foram obtidos dos camundongos fêmeas BALB/c mantenedoras de ciclo, foram necropsiadas por deslocamento cervical e os cisticercos foram retirados de sua cavidade peritoneal, colocados em placa de Petri esterilizada e lavados com solução fisiológica estéril. Posteriormente os cisticercos foram separados de acordo com suas características macroscópicas em estágio inicial (vesícula translúcida e sem brotamentos); em estágio larval (translúcida e com brotamentos) e em estágio final (opaca e sem brotamentos) (Vinaud et al. 2007). Os cisticercos em estágio inicial foram os escolhidos para serem

utilizados no experimento, por serem aqueles que se encontram em rápida proliferação e por isso os que mais sentiriam os efeitos dos fatores estressantes.

A densidade foi de 10 cisticercos por poço (placa de cultura de 24 poços), com 1,0 mL de meio RPMI suplementado com L-Glutamina, soro fetal bovino ativado a 10 %, penicilina/estreptomicina 1/1000 (200.000 U), Hepes 1,0 M, 2-mercaptoetanol.

Ao meio de cultura foi adicionado glicose até se obter concentrações de 56 e 120 mM/mL, ou insulina glargina (Lantus®) 1,5 ou 2,0 U/mL, ou albendazol (Laboratório Teuto) 0,05 e 0,075 µg/ mL, ou praziquantel (Merck) 0,03 e 0,06 µg/ mL. Ou apenas meio RPMI suplementado no caso do grupo controle. A concentração dos fármacos foi correspondente a DL₅₀ de acordo com Palomares et al. (2004). Após 24 horas de cultivo em estufa 37° C com 5% de CO₂ os cisticercos foram retirados da placa e o meio de cultura foi aliqotado em eppendorfs e após procedeu-se o congelamento do meio de cultura com nitrogênio líquido, objetivando a estase das reações metabólicas. Após, o meio de cultura passou por processo de extração dos ácidos orgânicos e posteriormente os produtos secretados/excretados (SE) pelos cisticercos foram, então, analisados conforme metodologia adaptada de Vinaud et al. (2007)

4.3-Padronização dos reagentes de uso e preparo do meio de cultura

O meio RPMI® (Invitrogen, Gibco) solução estoque utilizado foi preparado a partir de meio RPMI® comercial liofilizado 10,4 g, bicarbonato de sódio 1,0 g, H₂O q.s.p 1,0 Litro, pH entre 7,2-7,4, filtrado em membrana de 0,22 µm utilizando bomba à vácuo e estocado em temperatura de 2° C a 8° C.

O meio RPMI® suplementado consistiu de L-Glutamina 200 mM, soro fetal bovino ativado a 10 %, penicilina/estreptomicina 1/1000 (200.000 U), Hepes 1,0 M, 2-mercaptoetanol 50 mM.

A cada poço da placa de cultura foram adicionados 10 ou 20 µL de solução hipertônica de glicose a 50 % para obter respectivamente concentrações de 56 mM e 120 mM.

As concentrações de insulina (Lantus®) usadas foram 1,5 e 2,0 U/mL. O praziquantel (Merck) foi empregado nas concentrações de 0,03 µg e 0,06 µg/ mL e o albendazol (Laboratório Teuto) 0,05 µg e 0,075 µg/ mL (ambos dissolvidos em etanol) correspondentes a DL₅₀ de acordo com Palomares et al (2004).

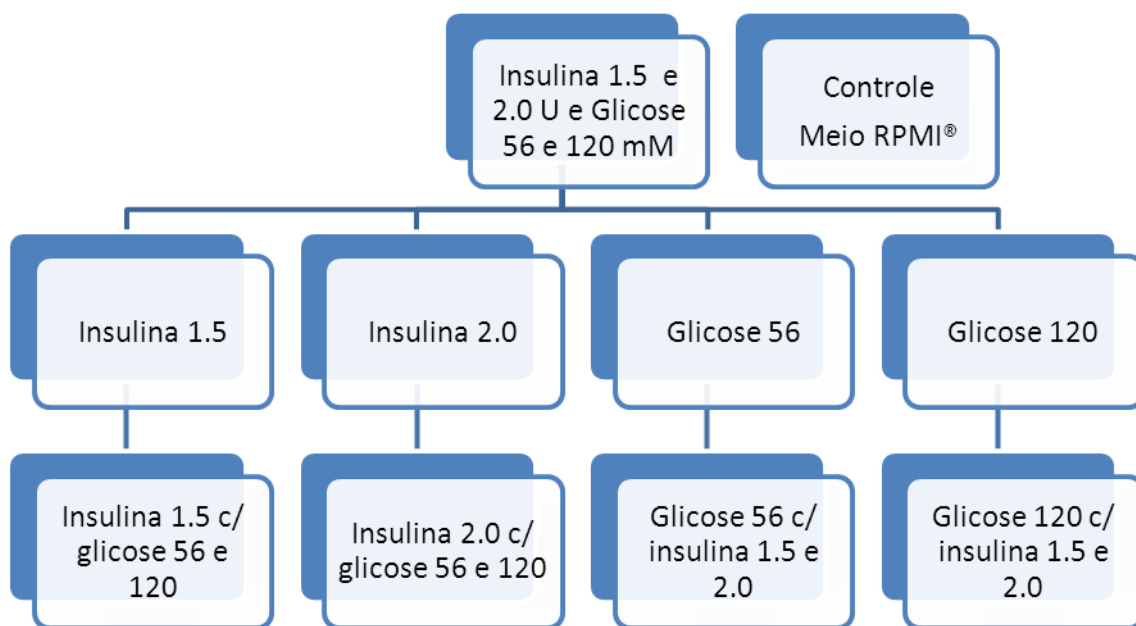


Figura 7- Fluxograma esquematizando o tratamento *in vitro* de cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos a glicose (mM/mL) e insulina (U/mL) e grupo controle.

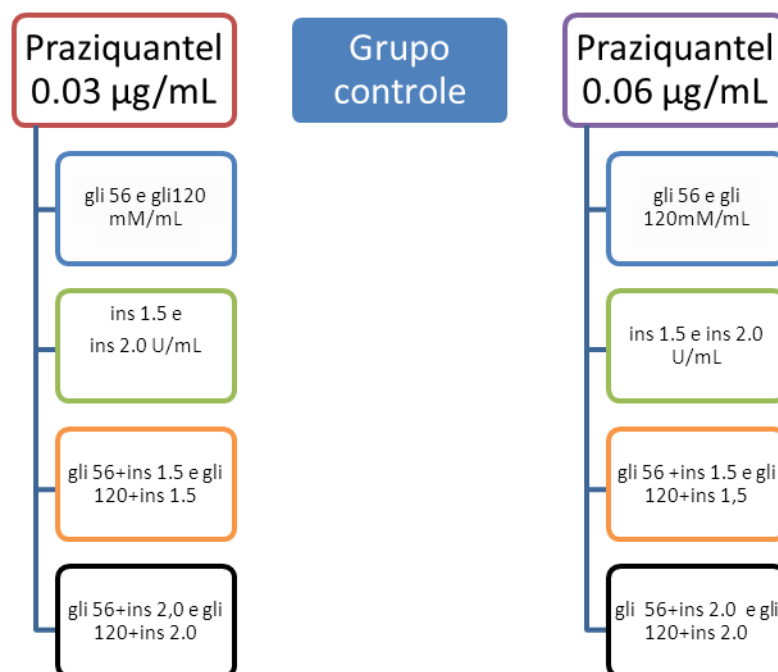


Figura 8 - Fluxograma esquematizando o tratamento *in vitro* de cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos ao praziquantel 0.03 e 0.06 µg/mL e diferentes concentrações de glicose (mM/mL) e insulina (U/mL) e grupo controle.

O grupo controle consistiu de meio 1,0 mL RPMI® suplementado e 10 cisticercos por poço.

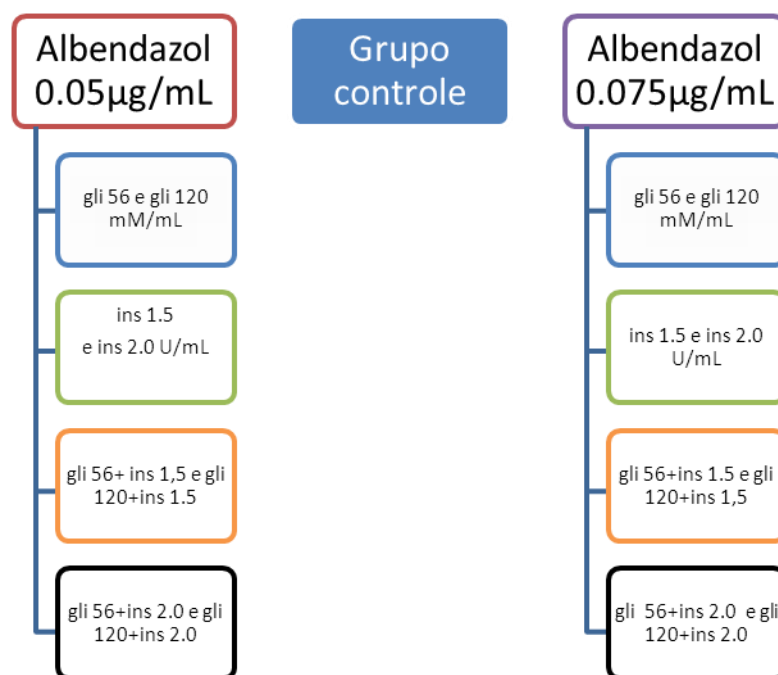


Figura 9-Fluxograma esquematizando o tratamento *in vitro* de cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos ao albendazol 0.05 e 0.075 µg/mL e diferentes concentrações de glicose (mM/mL) e insulina (U/mL) e grupo controle.

4.4- Extração e análise de ácidos orgânicos secretados/excretados

Os ácidos orgânicos presentes no meio RPMI® no qual os cisticercos foram mantidos em cultura foram extraídos com a utilização de uma coluna cromatográfica de troca iônica (Bond Elut® - Varian). Com auxílio de uma bomba a vácuo, esta coluna de extração foi ativada com 1 mL de HCl (0,5 mol/L), 1 mL de Metanol e 2 mL de H₂O ultrafiltrada. Em seguida foi aplicado 250 µL da amostra. Após a aplicação da amostra, foram acrescentados 2 mL de água ultrafiltrada e o Bond Elut retirado da bomba a vácuo. Logo após foram aplicados 250 µL de H₂SO₄ (0,5 M) e o material foi centrifugado a 500 g/5 minutos a 20° C (Bezerra et al.1999).

As amostras resultantes foram submetidas à cromatografia líquida (HPLC-Varian ProStar) com uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex ion exclusion HPX – 87H (300

X 7,8 mm). A coluna de separação é protegida por uma coluna de proteção BIORAD-Aminex HPX – 85. O eluente utilizado na fase móvel foi o ácido sulfúrico (5 mMol/L) à temperatura de 30°C, com vazão de 0,6 mL/min, acoplado a um detector UV/visível em comprimento de onda de 210nm. Cada amostra injetada corresponde a um volume de 40µL (Bezerra et al. 1999; Vinaud et al 2007). O tempo de retenção dos ácidos orgânicos e as áreas dos picos das substâncias detectadas foram calculadas por um programa computadorizado acoplado ao cromatógrafo: Star Chromatography Workstation 5.0 Varian, fornecendo sua concentração nas amostras. Os ácidos orgânicos foram identificados de acordo com o tempo de retenção e com calibração previamente realizada no HPLC. Os ácidos orgânicos analisados indicam glicólise (piruvato e lactato), ciclo do ácido cítrico (succinato, fumarato e malato) e metabolismo de ácidos graxos (acetato, propionato e β -hidroxibutirato) (Bezerra et al. 1999).

4.5- Análises estatísticas

As análises foram realizadas em triplicata e as concentrações dos ácidos orgânicos foram comparadas através do ANOVA. As diferenças foram consideradas estatísticas quando $p < 0,05$.

5- RESULTADOS

Através deste estudo, avaliou-se a SE de ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps*, em estágio inicial, mantidos em meio de cultura RPMI® suplementado e utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para detecção dos ácidos. Foram empregados juntamente ao meio de cultura os fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel em baixas doses, glicose e insulina, todos em duas concentrações. O estudo avaliou mudanças no metabolismo do parasito que podem ocorrer quando em ambientes hostis.

5.1- Secreção/excreção de lactato e piruvato

Não houve diferença estatística na SE de lactato entre o grupo controle e o grupo tratado com insulina e glicose isoladas ou em associação (tabela 1 e 2). Nos grupos expostos ao praziquantel em concentração de 0,03 µg/mL isolado ou associado à glicose ou insulina também não houve influência na SE de lactato em relação ao grupo controle (tabela 3), assim como nos grupos tratados com praziquantel 0,06 µg/mL isolado ou associado de glicose ou insulina (tabela 4). De modo semelhante, também não houve diferença estatística na SE de lactato entre o grupo controle e os grupos tratados com albendazol 0,05 µg/mL (tabela 5).

Apenas no grupo tratado com albendazol 0,075 µg/mL (tabela 6) associado à glicose em concentração de 120 mM/mL houve influência na SE de lactato em relação ao grupo controle, havendo maior SE de lactato ($p < 0,05$).

Não foi detectada SE de piruvato nos grupo controle nem nos grupos tratados com insulina e glicose isoladas ou associadas (tabela 1 e 2). Também não foi detectada SE de piruvato nos grupos tratados com praziquantel 0,03 µg/mL (tabela 3) e praziquantel 0,06 µg/mL (tabela 4) e nem nos grupos tratados com albendazol 0,05 µg/mL (tabela 5) e 0,075 µg/mL (tabela 6).

Tabela 1- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* à diferentes concentrações de glicose e insulina.

Ácidos orgânicos	Controle	Glicose 56	Glicose 120	Insulina 1,5	Insulina 2,0
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	2,59 $\pm$ 1,09	2,61 $\pm$ 0,57	2,89 $\pm$ 1,02	2,50 $\pm$ 0,35
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,012	0,13 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	9,60 $\pm$ 2,40	10,58 $\pm$ 1,90*	10,56 $\pm$ 4,97	8,00 $\pm$ 1,00*
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	47,67 $\pm$ 12,39*	66,60 $\pm$ 22,31*	110,59 $\pm$ 15,60*	92,81 $\pm$ 17,86*
Lactato	2,50 $\pm$ 0,87	3,09 $\pm$ 0,72	3,06 $\pm$ 0,28	2,84 $\pm$ 0,43	2,40 $\pm$ 0,33
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	11,26 $\pm$ 7,78	21,78 $\pm$ 11,06	17,31 $\pm$ 7,29	22,76 $\pm$ 6,47
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	17,31 $\pm$ 10,35	ND	ND	22,87 $\pm$ 13,89
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	1,28 $\pm$ 0,08	1,50 $\pm$ 1,26	1,11 $\pm$ 0,41*	0,80 $\pm$ 0,16*
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	33,79 $\pm$ 4,87	ND	ND	ND

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$).
Glicose (mM/mL); Insulina (U/mL)

5.2- Secreção/excreção de oxaloacetato e citrato

Não houve diferença estatisticamente relevante na SE de oxaloacetato entre o grupo controle e os grupos expostos a glicose e insulina (tabela 1 e 2). Entretanto nos grupos de cisticercos tratados com praziquantel 0,03 μ g/mL não houve detecção na SE de oxaloacetato, só houve detecção na SE de oxaloacetato no grupo tratado com praziquantel 0,03 μ g/mL associado de insulina 1,5 U e glicose 120 mM/mL (tabela 3).

Nos grupos tratados com praziquantel 0,06 μ g/mL (tabela 4) isolado ou associado de glicose ou insulina não houve influência na SE de oxaloacetato.

Também os grupos tratados com albendazol 0,05 μ g/mL (tabela 5) e 0,075 μ g/mL (tabela 6), não demonstraram diferença na SE de oxaloacetato em relação ao grupo controle.

O tratamento com glicose e insulina isoladas ou em associação também não influenciou a SE de citrato comparado ao grupo controle (tabela 1 e 2). Assim como os

grupos tratados com praziquantel 0,03 µg/mL (tabela 3) e 0,06 µg/mL (tabela 4) isolados ou associados de glicose e insulina.

Apenas no grupo tratado com albendazol 0,05 µg/mL associado de insulina 1,5 U/mL e glicose 56 mM/mL (tabela 5) houve menor secreção de citrato em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Já nos grupos tratados com albendazol 0,075 µg/mL não houve diferença na SE de citrato em relação ao grupo controle (tabela 6).

Tabela 2- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* à diferentes concentrações de glicose e insulina associados.

Ácidos orgânicos	Controle	Gli 56+Ins 1.5	Gli 56+Ins 2.0	Gli 120+Ins 1.5	Gli 120+Ins 2.0
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	1.50 $\pm$ 0.30	1.79 $\pm$ 0.73	1.04 $\pm$ 0.03	1.48 $\pm$ 0.78
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,04	0.097 $\pm$ 0.03	ND	ND
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	7.80 $\pm$ 1.56	9.22 $\pm$ 0.19	9.18 $\pm$ 0.16	7.37 $\pm$ 0.84
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	90.39 $\pm$ 41.14*	73.50 $\pm$ 11.01*	25.55 $\pm$ 18.60	70.62 $\pm$ 55.28
Lactato	2,50 $\pm$ 0,87	2.40 $\pm$ 0.19	2.24 $\pm$ 0.45	3.41 $\pm$ 1.40	2.17 $\pm$ 0.58
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	26.0 $\pm$ 2.58	20.15 $\pm$ 3.36	3.28 $\pm$ 1.25	6.39 $\pm$ 0.61
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	17.57 $\pm$ 9.33	22.87 $\pm$ 6.31	14.20 $\pm$ 12.04	7.34 $\pm$ 3.33
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	3.19 $\pm$ 2.94	1.40 $\pm$ 0.27	ND	1.15 $\pm$ 0.16*
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	ND	ND	14.63	8.28 $\pm$ 0.32

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$); gli 56

– glicose 56 mM/mL – gli 120 – glicose 120 mM/mL - ins 1,5 - insulina 1,5 U/mL– ins 2,0

– insulina 2,0 U/mL;

5.3- Secreção/excreção de malato e fumarato

O grupo tratado com glicose 120 mM/mL apresentou SE de malato menor que o grupo controle, assim como o grupo de cisticercos tratados com insulina 2,0 U/mL (tabela 1) ($p < 0,05$). Associação de insulina e glicose nas duas concentrações não influenciou na SE de malato (tabela 2). Entre o grupo controle e os grupos tratados com praziquantel 0,03 µg/mL, insulina 1,5U/mL e glicose 56 Mm/mL houve diferença onde o grupo tratado apresentou SE de malato menor que o grupo controle (tabela 3) ($p < 0,05$).

O grupo tratado com praziquantel 0,03 µg/mL insulina 1,5 U/mL e glicose 120 mM/mL apresentou de malato ainda menor que o grupo tratado com praziquantel 0,03 µg/mL insulina 1,5 U/mL e glicose 56 mM/mL (tabela 3) ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença na SE de malato em relação ao grupo controle (tabelas 4, 5 e 6).

A presença de glicose em ambas as concentrações não influenciou na SE de fumarato em relação ao grupo controle (tabela 1), também a adição de insulina em ambas as concentrações aos grupos tratados com glicose 56 mM/mL não apresentou diferença na SE de fumarato em relação ao grupo controle (tabela 2). Já a insulina isoladamente em ambas as concentrações induziu menor SE de fumarato do que o grupo controle ($p < 0,05$). No grupo tratado com insulina 1,5 U/mL e glicose 120 mM/mL não foi detectada SE de fumarato (tabelas 1 e 2).

A tabela 3 mostra que não houve diferença na SE de fumarato entre o grupo controle e os tratados com praziquantel 0,03 µg/mL e insulina 2,0 U/mL, assim como os cisticercos tratados com praziquantel 0,03 µg/mL e glicose 56 mM/mL também praziquantel 0,03 µg/mL e insulina 1,5 U/mL com glicose 120 mM/mL e ainda praziquantel 0,03 µg/mL insulina 2,0 U/mL e glicose 120 mM/mL.

Os grupos tratados com praziquantel 0,03 µg/mL insulina 1,5 U/mL e 2,0 U/mL e glicose 56 mM/mL apresentaram menor SE que os grupos controle (tabela 3) ($p < 0,05$). Não houve detecção de fumarato no grupo tratado com praziquantel 0,03 µg/mL e glicose 120 mM/mL (tabela 3).

Não houve diferença na SE de fumarato entre o grupo controle e o tratado com praziquantel 0,06 µg/mL isolado ou adicionado de insulina e glicose em ambas as concentrações (tabela 4).

Albendazol 0,05 µg/mL, insulina e glicose em ambas as concentrações isolados ou associados não influenciaram na SE de fumarato em relação ao grupo controle (tabela 5). Bem como o albendazol 0,075 µg/mL, insulina e glicose em ambas as

concentrações isolados ou associados não influenciaram na SE de fumarato em relação ao grupo controle (tabela 6).

Tabela 3- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao praziquantel em concentração de 0,03 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina.

			Pzq 0.03+ins	Pzq	Pzq	Pzq	Pzq	Pzq	Pzq	Pzq
Ácidos orgânicos	Controle	Pzq 0.03	1.5	0.03+ins	0.03+gli 56	0.03+gli 120	0.03+ins	0.03+ins	0.03+ins	0.03+ins
				2.0			1.5+gli 56	1.5+gli 120	2.0+gli 56	2.0+gli 120
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	1,41 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 1,43	3,50 $\pm$ 0,88	4,10 $\pm$ 2,02	2,66 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,43	2,70 $\pm$ 0,27	2,08 $\pm$ 1,10	2,16 $\pm$ 0,15
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,14 $\pm$ 0,04	ND	ND
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	10,14 $\pm$ 0,46	16,71 $\pm$ 8,81	13,46 $\pm$ 2,31	10,18 $\pm$ 7,40	7,03 $\pm$ 3,16	4,35 $\pm$ 0,53*	4,17 $\pm$ 0,96*	9,42 $\pm$ 2,91	14,58 $\pm$ 4,34
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	16,57 $\pm$ 2,35	26,24 $\pm$ 5,54	23,09 $\pm$ 3,80	19,68 $\pm$ 3,09	ND	ND	ND	5,10 $\pm$ 2,56	38,60 $\pm$ 21,15
Lactato	2,50 $\pm$ 0,61	1,83 $\pm$ 0,16	3,49 $\pm$ 2,06	3,15 $\pm$ 0,44	2,42 $\pm$ 1,01	2,02 $\pm$ 0,42	1,19 $\pm$ 0,33	3,83 $\pm$ 0,99	3,41 $\pm$ 0,57	3,22 $\pm$ 0,93
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	1,23 $\pm$ 1,82	6,91 $\pm$ 3,02	8,90 $\pm$ 5,07	3,43 $\pm$ 0,93*	2,45 $\pm$ 0,63*	ND	15,31 $\pm$ 3,97	3,41 $\pm$ 1,49	6,66 $\pm$ 1,24
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	ND	5,06 $\pm$ 0,55*	5,18 $\pm$ 1,24*	3,36 $\pm$ 1,06	ND	ND	15,18 $\pm$ 9,33	8,59 $\pm$ 1,76*	10,34 $\pm$ 2,32*
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	1,20 $\pm$ 0,006	1,94 $\pm$ 0,89	1,37 $\pm$ 0,35	1,23 $\pm$ 0,50	ND	0,43 $\pm$ 0,11*	2,32 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,30*	1,92 $\pm$ 0,40
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	62,45 $\pm$ 18,32	104,66 $\pm$ 56,23	30,83 $\pm$ 4,62	33,48 $\pm$ 9,08	15,93 $\pm$ 5,30	78,09 $\pm$ 7,20	25,54 $\pm$ 12,09	29,93 $\pm$ 2,66	35,40 $\pm$ 1,87

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$); pzq 0,03 – praziquantel 0,03 μ g/mL - ins 1,5 - insulina 1,5

U/mL – ins 2,0 – insulina 2,0 U/mL - gli 56 – glicose 56 mM/mL – glicose 120 – glicose 120 mM/mL.

Tabela 4- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao praziquantel em concentração de 0,06 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina.

Ácidos orgânicos	Controle	Pzq 0.06	Pzq 0.06+ins 1.5	Pzq 0.06+ins 2.0	Pzq 0.06+gli 56	Pzq 0.06+gli 120	Pzq 0.06+ins 1.5+gli 56	Pzq 0.06+ins 1.5+gli 120	Pzq 0.06+ins 2.0+gli 56	Pzq 0.06+ins 2.0+gli 120
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	1,75 $\pm$ 0,27	2,93 $\pm$ 1,04	2,81 $\pm$ 0,61	2,28 $\pm$ 0,40	2,58 $\pm$ 0,51	1,81 $\pm$ 0,94	2,37 $\pm$ 0,55	2,10 $\pm$ 0,81	1,59 $\pm$ 0,09
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	ND	0,17 $\pm$ 0,11	ND	ND	0,14 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,10	0,09 $\pm$ 0,03
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	13,25 $\pm$ 3,28	24,83 $\pm$ 2,40	15,33 $\pm$ 2,67	15,92 $\pm$ 5,46	21,53 $\pm$ 2,76	15,40 $\pm$ 6,36	16,69 $\pm$ 1,41	19,36 $\pm$ 7,18	16,24 $\pm$ 3,49
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	ND	7,64 $\pm$ 1,90	17,29 $\pm$ 11,98	12,74 $\pm$ 2,69	27,49 $\pm$ 0,06	24,97 $\pm$ 11,01	17,80 $\pm$ 9,46	32,08 $\pm$ 8,46	24,15 $\pm$ 11,08
Lactato	2,50 $\pm$ 0,61	2,88 $\pm$ 0,06	3,22 $\pm$ 0,52	2,65 $\pm$ 0,76	2,44 $\pm$ 0,44	2,92 $\pm$ 0,31	2,82 $\pm$ 0,74	2,95 $\pm$ 0,76	3,50 $\pm$ 1,03	2,55 $\pm$ 0,08
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	7,04 $\pm$ 1,33	7,64 $\pm$ 1,90	10,33 $\pm$ 1,73	5,92 $\pm$ 3,37	11,58 $\pm$ 6,00	8,69 $\pm$ 3,45	8,56 $\pm$ 4,20	11,86 $\pm$ 10,27	5,44 $\pm$ 0,58
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	3,49 $\pm$ 0,27	3,48 $\pm$ 0,30	ND	3,82 $\pm$ 1,00	5,91 $\pm$ 2,05	2,30 $\pm$ 0,24*	3,13 $\pm$ 0,01	9,95 $\pm$ 5,99*	5,59 $\pm$ 1,70
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	1,44 $\pm$ 0,30	2,81 $\pm$ 0,89	2,09 $\pm$ 0,41	2,10 $\pm$ 0,80	2,93 $\pm$ 0,12	1,93 $\pm$ 0,93	2,23 $\pm$ 0,18	2,11 $\pm$ 0,84	1,89 $\pm$ 0,47
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	4,00 $\pm$ 0,14	33,40 $\pm$ 1,87	30,88 $\pm$ 10,18	75,60 $\pm$ 41,54	20,35 $\pm$ 4,17	63,08 $\pm$ 11,29	27,88 $\pm$ 0,14	27,91 $\pm$ 1,39	25,36 $\pm$ 1,28

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$). pzq 0,06 – praziquantel 0,06 μ g/mL - ins 1,5 - insulina 1,5

U/mL – ins 2,0 – insulina 2,0 U/mL - gli 56 – glicose 56 mM/mL – glicose 120 – glicose 120 mM/mL.

5.4- Secreção/excreção de succinato

As tabelas 1 e 2 mostram que os grupos tratados com glicose com concentração de 56 mM/mL, glicose 120 mM/mL, Insulina 1,5 U/mL, insulina 2,0 U/mL, isolados e os associados insulina 1,5 U/mL com glicose 56 mM/mL e insulina 2,0 U/mL com glicose 56 mM/mL apresentaram SE maiores que o controle ($p < 0,05$). Entretanto, os grupos de insulina associados à glicose 120 mM/mL não apresentaram diferença em relação ao controle.

Não houve diferença na S/E entre os grupos controle e os tratados com praziquantel 0,03 µg/mL isolado ou associado à glicose e insulina em ambas concentrações (tabela 3) assim como praziquantel 0,06 µg/mL isolado ou associado a glicose e insulina em ambas concentrações (tabela 4).

Albendazol 0,05 µg/mL insulina 2,0 U/mL não influenciaram a SE de succinato assim como albendazol 0,05 µg/mL associado com glicose 56 mM/mL e albendazol 0,05 µg/mL com glicose 120 mM/mL (tabela 5). Também no grupo tratado com albendazol 0,05 µg/mL insulina 1,5 U/mL e glicose 120 mM/mL não houve diferença na SE de succinato em relação aos grupos controle. Albendazol 0,05 µg/mL insulina 1,5 U/mL e glicose 56 mM/mL apresentaram menor SE que o grupo controle. Também albendazol 0,05 µg/mL com insulina 2,0 U/mL e glicose 56 mM/mL (tabela 5). Albendazol 0,075 µg/mL insulina e glicose isolados ou associados não influenciaram na SE de succinato (tabela 6).

Tabela 5- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao albendazol em concentração de 0,05 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina.

		Alb 0.05	Alb 0.05	Alb 0.05	Alb 0.05	Alb 0.05+gli	Alb 0.05+ins	Alb 0.05+ins	Alb 0.05+ins	Alb 0.05+ins
Ácidos orgânicos	Controle		0.05+ins	+ins 2.0	+gli 56	120	1.5+gli 56	1.5+gli 120	0.05+ins	0.05+ins
			1.5						2.0+gli 56	2.0+gli 120
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	3,06 $\pm$ 0,27	1,54 $\pm$ 0,39	1,54 $\pm$ 0,36	2,62 $\pm$ 0,67	1,57 $\pm$ 1,01	1,06 $\pm$ 0,40*	1,54 $\pm$ 0,43	1,37 $\pm$ 0,23	1,53 $\pm$ 0,13
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,15	0,16 $\pm$ 0,056	0,09 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,03	ND
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	16,82 $\pm$ 0,97	14,14 $\pm$ 1,07	12,27 $\pm$ 4,87	19,71 $\pm$ 4,12	14,80 $\pm$ 6,36	10,32 $\pm$ 6,26	13,98 $\pm$ 2,15	10,65 $\pm$ 0,72	14,70 $\pm$ 3,25
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	19,14 $\pm$ 2,41	29,41 $\pm$ 5,34	37,47 $\pm$ 2,12	20,44 $\pm$ 8,08	32,27 $\pm$ 4,06	11,84 $\pm$ 3,24*	33,14 $\pm$ 10,72	18,19 $\pm$ 2,46*	ND
Lactato	2,50 $\pm$ 0,61	2,36 $\pm$ 0,43	3,16 $\pm$ 1,11	2,65 $\pm$ 0,67	3,25 $\pm$ 0,55	2,69 $\pm$ 0,54	1,80 $\pm$ 0,81	2,87 $\pm$ 0,62	1,49 $\pm$ 0,28	3,54 $\pm$ 1,33
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	18,85 $\pm$ 0,57	10,40 $\pm$ 5,95	9,60 $\pm$ 7,34	15,05 $\pm$ 9,81	13,88 $\pm$ 8,24	6,81 $\pm$ 5,53	9,02 $\pm$ 4,47	8,76 $\pm$ 4,57	9,75 $\pm$ 5,45
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	ND	ND	2,98 $\pm$ 0,33	5,97 $\pm$ 0,34	ND	4,30 $\pm$ 1,57	3,09 $\pm$ 0,27	ND	ND
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	2,07 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,45	1,73 $\pm$ 0,75	2,77 $\pm$ 0,51	2,39 $\pm$ 0,86	1,30 $\pm$ 0,68	1,61 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,22	2,23 $\pm$ 0,70
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	25,17 $\pm$ 2,62	43,82 $\pm$ 6,78	33,01 $\pm$ 2,65	42,84 $\pm$ 4,34	81,01 $\pm$ 38,84	128,94 $\pm$ 61,94	26,66 $\pm$ 1,77	22,59 $\pm$ 0,08	24,32 $\pm$ 0,85

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$); alb 0,05 – albendazol 0,05 μ g/mL - ins 1,5 - insulina 1,5 U/mL

– ins 2,0 – insulina 2,0 U/mL - gli 56 – glicose 56 mM/mL – glicose 120 – glicose 120 mM/mL.

Tabela 6- Concentração média ($\pm$ desvio padrão) de ácidos orgânicos (nM/L) secretados/excretados por cisticercos de *Taenia crassiceps* expostos *in vitro* ao albendazol em concentração de 0,075 μ g/mL e diferentes concentrações de glicose e insulina.

Ácidos orgânicos	Controle	Alb 0.075	Alb 0.075+ins 1.5	Alb 0.075+ins 2.0	Alb 0.075+gli 56	Alb 0.075+gli 120	Alb 0.075+ins 1.5+gli 56	Alb 0.075+ins 1.5+gli 120	Alb 0.075+ins 2.0+gli 56	Alb 0.075+ins 2.0+gli 120
Citrato	2,23 $\pm$ 0,82	2,01 $\pm$ 0,54	1,57 $\pm$ 0,36	2,06 $\pm$ 1,68	2,06 $\pm$ 1,15	2,62 $\pm$ 0,89	2,40 $\pm$ 1,24	1,70 $\pm$ 0,92	2,30 $\pm$ 0,39	1,84 $\pm$ 0,95
Oxaloacetato	0,14 $\pm$ 0,06	ND	1,59 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,03	ND	0,18 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,10	0,17 $\pm$ 0,06
Malato	16,86 $\pm$ 5,68	12,45 $\pm$ 7,49	12,30 $\pm$ 1,87	13,70 $\pm$ 3,78	7,47 $\pm$ 0,28	19,49 $\pm$ 2,81	17,64 $\pm$ 4,78	17,22 $\pm$ 4,25	21,64 $\pm$ 11,2	18,30 $\pm$ 5,80
Succinato	22,84 $\pm$ 7,29	4,52 $\pm$ 1,36	15,95 $\pm$ 12,57	ND	ND	45,25 $\pm$ 17,53	12,56 $\pm$ 12,13	20,85 $\pm$ 0,64	19,22 $\pm$ 0,97	24,29 $\pm$ 17,5
Lactato	2,50 $\pm$ 0,61	1,38 $\pm$ 0,26	3,10 $\pm$ 0,56	2,89 $\pm$ 0,81	1,60 $\pm$ 0,20	3,78 $\pm$ 0,52*	3,43 $\pm$ 0,38	3,16 $\pm$ 0,31	3,19 $\pm$ 0,50	3,08 $\pm$ 0,38
β -hidroxibutirato	11,68 $\pm$ 5,26	8,63 $\pm$ 5,16	12,78 $\pm$ 5,08	9,10 $\pm$ 6,01	4,98 $\pm$ 10,28	13,83 $\pm$ 4,11	15,07 $\pm$ 3,33	10,09 $\pm$ 6,94	7,84 $\pm$ 0,79	16,50 $\pm$ 8,33
Acetoacetato	3,24 $\pm$ 0,50	ND	5,16 $\pm$ 2,22	ND	ND	ND	4,33 $\pm$ 0,15	4,91 $\pm$ 0,80	3,34 $\pm$ 0,77	5,53 $\pm$ 1,99
Fumarato	2,70 $\pm$ 0,61	1,53 $\pm$ 0,82	0,79 $\pm$ 0,26	1,85 $\pm$ 0,39	0,82 $\pm$ 0,21	2,56 $\pm$ 0,18	2,73 $\pm$ 0,83	2,05 $\pm$ 0,68	2,59 $\pm$ 1,15	2,77 $\pm$ 0,99
Propionato	33,20 $\pm$ 10,72	24,59 $\pm$ 0,55	30,14 $\pm$ 1,27	79,03 $\pm$ 30,09	111,96 $\pm$ 1,61	37,63 $\pm$ 3,54	80,78 $\pm$ 35,69	28,80 $\pm$ 1,72	33,08 $\pm$ 2,43	43,76 $\pm$ 18,35

ND – ácido não detectado * - diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$); albendazol 0,075 – albendazol 0,075 μ g/mL - ins 1,5 - insulina 1,5 U/mL – ins 2,0 – insulina 2,0 U/mL - gli 56 – glicose 56 mM/mL – glicose 120 – glicose 120 mM/mL.

5.5- Secreção/excreção de propionato e β -hidroxibutirato

Não houve detecção de propionato nos grupos tratados com insulina e glicose isoladas ou associadas em ambas as concentrações (tabela 1 e 2).

Nos grupos tratados com praziquantel 0.03 $\mu\text{g/mL}$ houve aumento na SE de propionato, entretanto não houve diferença entre os grupos controle e os tratados com praziquantel 0,03 $\mu\text{g/mL}$ adicionado de glicose e insulina nas concentrações: (insulina 1.5 U/mL com glicose 120 mM/mL; insulina 2.0 U/mL com glicose 56 mM/mL e insulina 2.0 U/mL com glicose 120 mM/mL), como demonstrado na tabela 3.

Do mesmo modo, não houve diferença na SE de propionato entre os grupos controle e os tratados com praziquantel 0,06 $\mu\text{g/mL}$ adicionado de glicose e insulina em ambas as concentrações (tabela 4), mas houve diminuição na SE no grupo tratado somente com praziquantel 0.06 $\mu\text{g/mL}$.

Também os grupos tratados com albendazol 0,05 e 0,075 $\mu\text{g/mL}$ isolados ou com glicose em ambas as concentrações não apresentaram diferença na SE de propionato em relação ao controle (tabelas 5 e 6).

A SE de β -hidroxibutirato apresentou-se maior que o controle no grupo tratado com insulina 1.5 U/mL associada com glicose 120 mM/mL (tabelas 1 e 2) ($p < 0,05$).

Nos grupos tratados com praziquantel 0.03 $\mu\text{g/mL}$ adicionado com glicose 56 e 120 mM/mL houve menor SE que no grupo controle (tabela 3) ($p < 0,05$).

Nos demais grupos não houve influência na SE em relação ao controle.

5.6-Secreção/excreção de acetoacetato e acetato

Insulina e glicose isoladas ou associadas não influenciaram a SE de acetoacetato (tabelas 1 e 2).

Não houve detecção de SE de acetoacetato no grupo tratado com praziquantel 0.03 $\mu\text{g/mL}$ a não ser quando adicionados de insulina, então apresentando SE maior

que o grupo controle (tabela 3) ($p < 0,05$), quando adicionado apenas glicose não houve diferença.

Nos grupos tratados com Praziquantel 0.06 $\mu\text{g/mL}$ houve maior SE de acetoacetato no grupo adicionado de insulina 2.0 U/mL e glicose 56 mM/mL (tabela 4) ($p < 0,05$).

Nos grupos tratados com albendazol 0.05 $\mu\text{g/mL}$ e 0.075 $\mu\text{g/mL}$ isolados ou associados de glicose e insulina não houve influencia na SE de acetoacetato (tabelas 5 e 6).

Não foi detectada SE de acetato nem no grupo controle nem nos grupos tratados (tabelas de 1 a 6).

6-DISCUSSÃO

Através deste trabalho, analisou-se a SE de ácidos orgânicos referentes ao metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial, mantidos em meio de cultura e expostos à glicose, insulina e baixas doses de fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel. Devido principalmente ao emprego de cisticercos de *T. crassiceps* como modelo experimental para estudos de cisticercose causada pela forma larval de *T. solium*, estudos sobre seu metabolismo são consideráveis (Duong et al. 2006, Heldwein et al. 2006).

Glicose e insulina isoladas ou associadas não influenciaram SE de lactato (tabelas 1 e 2) assim como os demais grupos tratados com praziquantel e albendazol isolados ou associados. Vinaud et al. (2008) descreveram resultados semelhantes em estudos *in vitro* do metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* expostos as mesmas doses desses fármacos. O lactato é produto do catabolismo anaeróbio da glicose sugerindo que esses fármacos nas concentrações empregadas isolados ou associados à insulina e glicose não alteraram este modo de produção do parasito.

No grupo tratado com albendazol 0,075 µg/mL (tabela 6) associado à glicose em concentração de 120 mM/mL detectou-se maior SE de lactato em relação ao grupo controle. Na literatura foi descrito por Köller (2001) resultados semelhantes onde o tratamento com baixas doses desse fármaco aumentam a SE de lactato. No presente estudo o aumento da oferta de glicose pareceu aumentar a degradação citosólica de carboidrato induzindo uma produção anaeróbia de lactato, visto que um maior aporte de fonte energética possibilita a utilização de vias metabólicas energeticamente menos rentáveis.

A diminuição e mesmo ausência na SE de oxaloacetato nos grupos tratados com praziquantel 0.03 µg/mL sugere que pode ter ocorrido duas diferentes vias metabólicas:

1- o oxaloacetato pode ter sofrido ação da enzima desidrogenase málica citosólica dando origem a malato, que pode ser usado no ciclo do ácido cítrico mitocondrial em aerobiose ou, 2- ter sofrido a ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase, originando piruvato que pode além de ser usado no ciclo do ácido cítrico também em condições anaeróbicas originar lactato e ser excretado assim como descrito por Corbin et al. (1998).

A não influência na SE de oxaloacetato nos demais grupos pode significar que as baixas doses destes fármacos, tanto quanto as doses utilizadas de glicose e insulina isoladas ou associadas, não influenciaram a ação da enzima malato desidrogenase que gera oxaloacetato.

Vinaud et al. (2008) demonstraram que os fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel em baixas doses não parecem interferir na citrato sintase que origina citrato, entretanto não houve no estudo supra citado associação com glicose e insulina. No presente estudo a associação de albendazol 0.05 µg/mL com insulina 1.5 U/mL e glicose 56 mM/mL diminuiu a SE de citrato parecendo influenciar no metabolismo respiratório do cisticerco.

A diminuição na SE de malato (tabelas 1, 2 e 3) pode sugerir que o malato pode ter sido consumido na via citosólica ou atravessado a membrana mitocondrial para ser convertido em piruvato pelo ciclo do ácido cítrico ou convertido em fumarato na via da enzima fumarato redutase e que glicose e insulina possivelmente não afetaram as enzimas málica, a fumarase ou fumarato redutase. Zenka e Prokopic (1987) descreveram a ação dessas enzimas em cisticercos de *Taenia crassiceps*.

A não detecção de SE de fumarato (tabelas 2 e 3) sugere que pode ter sido convertido em succinato que pode ter sido excretado, convertido em propionato e excretado ou ainda utilizado no ciclo do ácido cítrico. A glicose na concentração utilizada pode ter afetado a enzima fumarato redutase mitocondrial. O fumarato é um ácido orgânico que participa do ciclo do ácido cítrico gerado pela ação da enzima fumarase no malato e que em reação inversa descrita em vários invertebrados, sofre

ação da enzima fumarato redutase para originar succinato. Este ácido, em condições de aerobiose, atua como doador de prótons para a cadeia respiratória e, em condições de anaerobiose, é excretado como descrito por Corbin et al. (1998).

A diminuição na SE de succinato (tabela 5) pode indicar seu consumo no processo de respiração aeróbia sugerindo que o tratamento com baixa dose de fármaco associado a menores concentrações de glicose e insulina não interferiram na respiração celular do cisticerco. Vinaud et al. (2008) obteve resultados semelhantes com baixas doses de fármacos entretanto sem o emprego de glicose e insulina.

No presente estudo a glicose e a insulina isoladas ou associadas (tabelas 1 e 2) estimularam SE de succinato sugerindo interferirem no metabolismo respiratório do estágio inicial do cisticerco, pois este metabólito em cisticercos é excretado como produto final do ciclo do ácido cítrico, sua concentração está diretamente relacionada aos processos respiratórios aeróbios como descrito por Corbin et al (1998).

A detecção de maior SE de propionato em relação ao grupo controle (tabela 3) sugere aumento de metabolismo alternativo como a oxidação de ácidos graxos, estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Fraga et al. (2012).

Presume-se que a ação do propionato seja semelhante ao descrito para o metabolismo de vertebrados, indicando que o metabolismo de ácidos graxos com produção de propionato atue como provedor de moléculas energéticas que serão convertidas em succinato e utilizadas na cadeia transportadora de elétrons sob situações de anaerobiose (Lehninger et al. 2011).

A detecção de maior SE de β -hidroxibutirato em relação ao grupo controle (tabela 2) sugere que a glicose na concentração de 56 mM/mL pode ter promovido aumento de acetoacetato por aumento de piruvato, citrato e acetil-coA.

Portanto, percebe-se que a presença *in vitro* de insulina e glicose induzem maior SE de propionato e β -hidroxibutirato pelos cisticercos de *T. crassiceps* em estágio inicial favorecendo uma via alternativa de energia. Enquanto que quando se adiciona baixas

doses de fármacos anti-helmínticos a estes cisticercos não se observou influência nas principais vias produtoras de energia.

Não foi detectada SE de piruvato nos grupos estudados. Estudos realizados por Corbin et al. (1998) demonstraram que a utilização do piruvato pelos cisticercos pode ocorrer em duas diferentes vias: a mitocondrial, que utiliza o piruvato no ciclo do ácido cítrico, o piruvato mitocondrial é convertido em Acetil-coA, devido ação do complexo da piruvato desidrogenase, gerando: citrato que participará do ciclo do ácido cítrico, ou acetato, que será excretado; ou a via citosólica na qual o piruvato é consumido pela lactato desidrogenase, produzindo lactato que é excretado

No presente estudo não foi detectada SE de piruvato, sugerindo seu consumo no ciclo do ácido cítrico. Estes resultados estão de acordo com obtidos por Vinaud et al (2008).

7-CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível analisar *in vitro* o metabolismo energético e respiratório de cisticercos de *T. crassiceps* expostos à glicose, insulina e baixas doses de fármacos anti-helmínticos albendazol e praziquantel.

As duas concentrações de glicose utilizadas (56 e 120 mM/mL) foram capazes de alterar o metabolismo energético e respiratório dos cisticercos. Foi possível observar que na concentração de 56 mM/mL, a glicose induziu maior SE de acetoacetato e succinato. E na concentração de 120 mM/mL induziu maior SE de succinato e hidroxibutirato.

As duas concentrações de insulina utilizadas (1.5 e 2.0 U/mL) foram capazes de alterar o metabolismo energético e respiratório dos cisticercos. Percebeu-se que a insulina em concentração de 1,5 U/mL induziu maior SE de succinato e hidroxibutirato. E na concentração de 2,0 U/mL induziu aumento na SE de succinato, acetoacetato e hidroxibutirato.

As duas concentrações de albendazol utilizadas (0,05 e 0,075µg/mL) em associação com glicose e insulina foram capazes de alterar o metabolismo energético e respiratório dos cisticercos. Percebeu-se que houve um aumento na SE de propionato.

As duas concentrações de praziquantel utilizadas (0,03 e 0,06µg/mL) em associação com glicose e insulina foram capazes de alterar o metabolismo energético e respiratório dos cisticercos. Observou-se que houve aumento na SE de propionato.

De forma geral, percebe-se que aumento nas concentrações de insulina e glicose levam a utilização preferencial de vias alternativas de produção de energia, detectadas pelas alterações nas concentrações de propionato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA www.anvisa.gov.br acessado dia 15/08/2013.

Arocker-Mettinger E, Huber-Spitzky V, Auer H, Grabner G, Stur M, 1992. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye. A case report. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 201(1):34-37.

Bagrade G, Kirjusina M, Vismanis K, Ozolins J, 2009. Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. *J Helminthol* 83: 63-68.

Ballweber, LR 2009. *Taenia crassiceps* subcutaneous cysticercosis in an adult dog. *Vet Rec* 165 (23): 693-694.

Banting F., G., Best, C., H., 1922. The internal secretion of the pancreas. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v II, n 5.

Banting FG, Best CH, 1922. The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 7, 465-480.

Bezerra JCB, Kemper A., Becker W., 1999. ProWle of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 779–784.

Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Sodré, C, 2006. Tratamento em massa para controle das hemintíases intestinais em área endêmica na Amazônia Brasileira. *Ver. Inst. Pat. Trop. S. Paulo*. V 48, n 4.

BRASIL. ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiadas nº 315, de 26 de outubro de 2005.

Bringaud F, Ebikeme C, Boshart M, 2010. Acetate and succinate production in amoebae, helminthes, diplomonads, trichomonads and trypanosomatids: common and diverse metabolic strategies used by parasitic lower eukaryotes. *Parasitology* Cambridge University (2010), 137, 1315-1331.

Chávez-Trejo H, Garcia-Vilchis D, Reynoso-Ducoing O, Ambrosio, JR, 2011. *In vitro* evaluation of the effects of cysticidal drugs in the *Taenia crassiceps* cysticerci ORF

strain using the fluorescent CellTracker CMFDA. *Experimental Parasitology* 127: 294-299.

Chermette R, Bussieras J, Marionneau J, Boyer E, Roubin C, Prophette B, Maillard H, Fabiani B, 1995. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. *Bull Acad Natl Med* 179 (4):777-783.

Chermette R, Bussieras J, Mialot M, Raynal PC, 1993. Subcutaneous *Taenia crassiceps* cysticercosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 203 (2): 263-265.

Chinnery JB, and Morris DL, 1986. Effect of albendazole sulphoxide on viability of hydatid protoescoleces *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. HYG.* 80: 815-817.

Cioli D, Pica-Mattoccia L., Archer S, 1995. Antischistosomal drugs: past, present and future? *Pharmacology & therapeutics* 68(1): 35-85.

Cioli D, Pica-Mattoccia L, 2002. Praziquantel. *Parasitol Res* 90: S3-S9.

Corbin I, Simcoff R, Novak M, Blackburn BJ, 1998. Metabolism of [3-13C]- pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* 84:516-518.

Davis SN; Granner, DK. Insulina, Hipoglicemiantes Orais e a Farmacologia do Pâncreas Endócrino. Em: Goodman, L. S.; Gilman, A . In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro – RJ, McGraw-Hill, cap. 61, p. 1263-1290, 10º Ed, 2005.

Del Arenal, IP, Rubio ME, Ramirez J, Rendón JL, Escamilla JE, 2005. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. *International journal for parasitology* 54:185-193.

Del Arenal IP, Flores AG, Poole RK, Escamilla JE 2001. *Taenia crassiceps* metacestodes have cytochrome oxidase aa₃ but not cytochrome o functioning as terminal oxidase. *Mol Biochem Parasitol* 114: 103-109.

Dorais FJ, Esch G.W, 1969. Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology* 25, 395–398.

- Duong TH, Monegierdu Sorbier C, Bailly ER, Guillou-Garnier MF, Fetissof F., Richard-Lenoble D, 2006. Cysticercosis contracted in metropolitan France. *La Presse medicale* 35:243-245.
- Dyer NW, Greve JH, 1998. Severe *Cysticercus longicollis* cysticercosis in a black lemur (*Eulemur macaco macaco*). *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 10(4):362-364.
- Erverhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA 2004. Intrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. . *J Parasitol* 90: 79-84.
- Escobedo, G., Romano, M.C., Morales-Montor, J., 2009. Differential *in vitro* effects of insulin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *Journal of Helminthology*. 83: 403-412.
- Fraga 2011. *Avaliação bioquímica in vivo do tratamento anti-helmíntico em cisticercos de Taenia crassiceps*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 80 pp.
- Fraga CM, Costa TL, Bezerra JCB, Junior RSL, Vinaud MC, 2012. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Experimental Parasitology*, 131: 111-115.
- François A, Favennec LP, Cambon-Michot C, Gueit I, Biga N, Tron F, Brasseur P, Hemet J 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: A new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome?. *Am Jour Surg Pathol* 22 (4): 488-492.
- Freeman RS, 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40:969-990.
- Freeman RS., Fallis M, Shea M, Maberley AL., Walters J, 1973. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). Part II. The parasite. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 22:493-495.
- Greenberg RM, 2005. Ca²⁺ signalling, voltage-gated Ca²⁺ channels and praziquantel in flatworm musculature. *Parasitology* 131: 97-108.

Heldwein K, Budermann H, Hamperl W, Bretzel G, Losher T, Laregina D, Frosh M, 2006. J. Trop. Med. 75 (1):108-111.

Hoberg EP, Ebinger W, Render JA 1999. Fatal cysticercosis by *Taenia crassiceps* (Cyclophyllidea: Taeniidae) in a presumed immunocompromised canine host. *J Parasitol* 85 (6): 1174-1178.

Horton J 2000. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology* 121: S113-S132.

Jimenes P, Valdez RA, Romano MC., Metabolism of steroid hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci, 2006. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 99, 203-208.

Katzung BG. Farmacologia. Hormônios pancreáticos e fármacos antidiabéticos. Vol. único, 11ª edição, p. 579-597, 2009.

Klinker H, Tintelnot K, Joeres R, Muller, Gross U, Schmidt-Rotte H, Landwehr P, Richter, E, 1992. *Taenia crassiceps* infection in AIDS. Deutsche medizinische Wochenschrift 117:133-138.

Köhler P, 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. International Journal for Parasitology 31:336-345.

Köhler P, Voigt WP, 1988. Nutrition and Metabolism. In: Melhorn H 1988. Parasitology in focus: facts and trends. Ed. Springer-Verlag. 1ª ed. 924p. Berlim, Alemanha.

Komuniecki R, Harris BG, 1995. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Copyright, p 49-62.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, 2011. Princípios de Bioquímica. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. São Paulo, SP.

Loos-Frank B 2000. An up-date of Verster's (1969) "Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus" (Cestoda) in table format. *Syst Parasitol* 45: 155-183.

Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Celerier P, 1998. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. AIDS 12:1551-1552.

Melhorn H, Franz M, Taraschewski H, Voigt WP, Walldorf V, 1988. Metazoan organization. In: Melhorn, H., 1988. Parasitology in focus: facts and trends. Ed. Springer-Verlag. 1ª ed. 924p. Berlim, Alemanha.

Merck®. www.msd-brazil.com Acessado em 10/08/2013.

Murray RK, Granner D, Mayes, PA., Rodwell VW, Harper's Biochemistry. 29ª ed, Copyright, p 610-626, 2013.

Ostoa-Saloma P, Ostoa-Jacobo P, Esquivel-Velázquez M, Bazúa S, Larralde C, 2010. Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci *in vitro* is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 2010, article ID510978, 5 pages.

Palomares F, Palencia G, Pérez R, Gonzalez-Esquivel D, Castro N, Cook HJ., 2004. *In vitro* effects of albendazole sulfoxido e praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. Antimicrobial agents and chemotherapy 48(6):2302-2304.

Palomares F, Palencia G, Ambrosio JR, Ortiz A, Cook HJ 2006. Evaluation fo the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in comination on *Taenia crassiceps*: *in vitro* studies. J Antimicrob Chemother 57: 482-488.

Rang HP; Dale MM. Farmacologia. Pâncreas endócrino e controle da glicemia. Vol. único, 7ª edição, p. 434-449, 2012.

Romano MC, Valdez RA, Cartas AL, Gomez Y, Larrald C., 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 85, 221-225.

Rosenfeld L, 2002. Insulin : Discovery and Controversy. Clinical Chemistry 48:12, 2270-2288.

Rosental PJ, Goldsmith RS, Farmacologia Clínica dos Anti-helmínticos. Em: Katzung, G.B., Basic and Clinical Pharmacology, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap 54, p741-750, 11ª ed, 2009.

Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO 2006. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. Vet Parasitol 139 (1-3): 168-179.

Sanofi-Aventis. www.sanofiaventis.com.br acessado 20/08/2013.

Smyth JD, McManus DP 1989. Physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press, Cambridge.

Stien A, Voutilaine L, Hausisalmi V, Fuglei W, Mork T, Yoccoz NG, Ims RA, Henttonen H 2010. Intestinal parasites of the Arctic fox in relation to the abundance and distribution of intermediate hosts. *Parasitology* 137 (1): 149-157.

Suzuki LA, Arruda GC, Quagliato EMAB, Rossi, C, L.,2007. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens of immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2):152-155, mar-abr.

Vargas-Parada , Solis CF, Laclette J,P, 2000. Heat shock and stress response of *T. solium* and *T. crassiceps*. *Parasitology* 122, 583-588.

Vaz AJ, Numes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 354-357.

Venkatesan V 1998. Albendazole. *J Antimicrob Chemother* 41: 145-147.

Vinaud MC 2007. *Vias do Metabolismo energético e respiratório em cisticercos de Taenia crassiceps in vivo e seu estudo in vitro sob ação de fármacos anti-helmínticos*, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 107 pp.

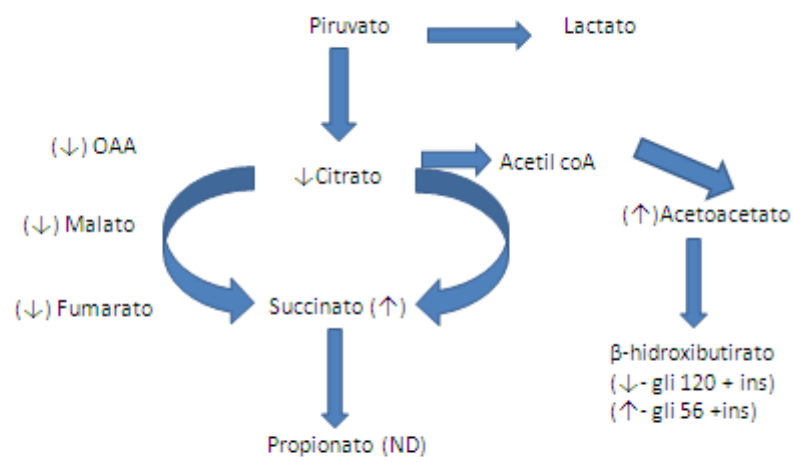
Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior RS, Bezerra JCB 2008. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Exp Parasitol* 120: 221-226.

Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior RS, Bezerra JCB 2009. *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Exp Parasitol* 122 (2): 208-211.

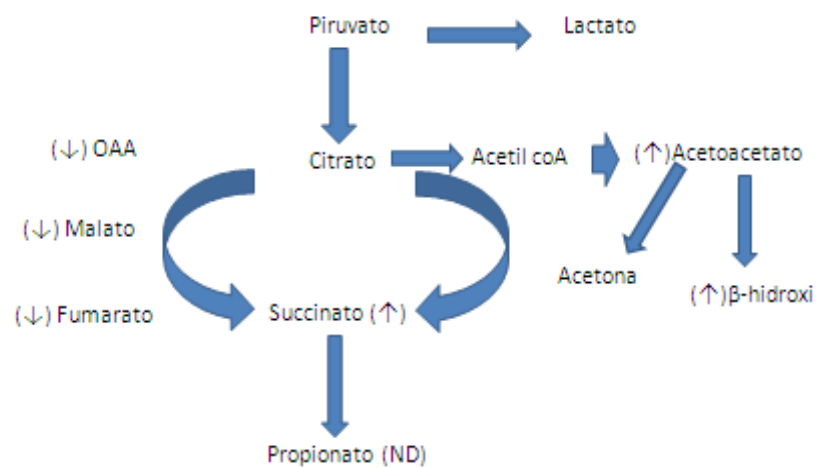
Vinaud MC, Lino Junior RS, Bezerra, JCB. 2007. *Taenia crassiceps* organic acids detect in cysticerci. *Exp Parasitol* 116: 335-339.

- Willms K, Presas AMF, Jiménez JA, Landa A, Zurabián R, Ugarte MEJ, Robert L 2005. Taeniid tapeworm responses to *in vitro* glucose. *Parasitol Res* 96: 296-301.
- Willms K, Zurabian R 2009. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 137 (3): 335-346.
- Wünschmann A, Garlie V, Averbek G, Kurtz H, Hoberg EP 2003. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *J Vet Diagn Invest* 15: 484-488.
- Zacone P, Cooke A, 2013. Helminth mediated modulation of Type 1 diabetes (T1D). *International Journal for Parasitology* 43: 311-318.c
- Zenka J, Kopacek P, Vokurkova N 1987. Studies on the properties of malic enzyme and malate dehydrogenase from *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800) cysticerci. *Folia Parasitol (Praha)* 34: 323-328.
- Zenka J, Prokopic J 1987. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarase reductase and succinate dehydrogenase in the larvae of *Taenia crassiceps* (Zelder, 1800). *Folia Parasitol (Praha)* 34: 131-136.

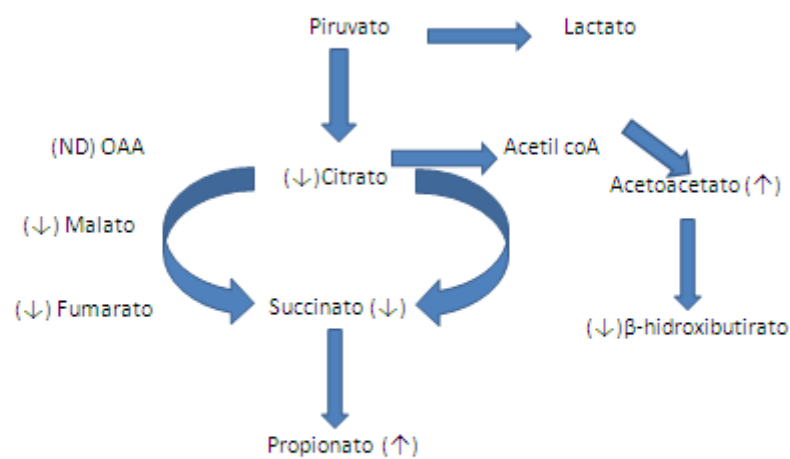
ANEXOS



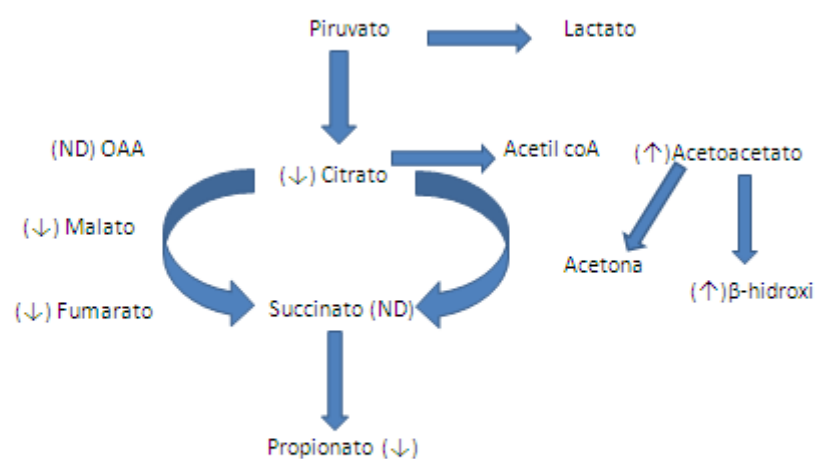
Glicose e insulina associate



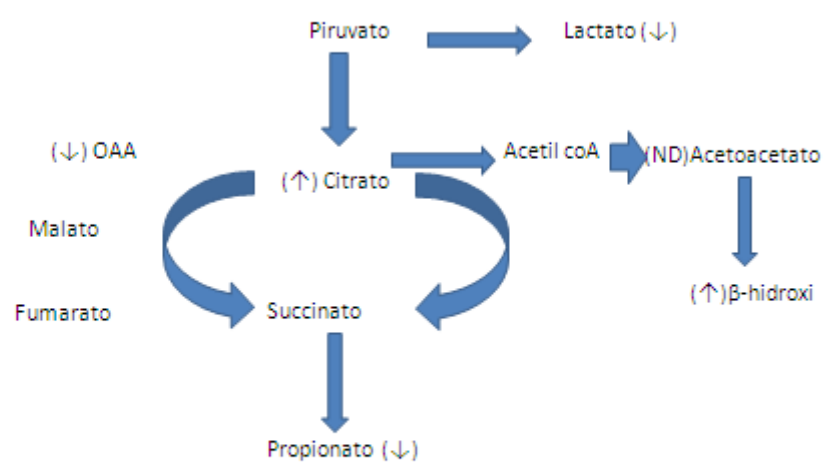
Glucose e insulina isoladas



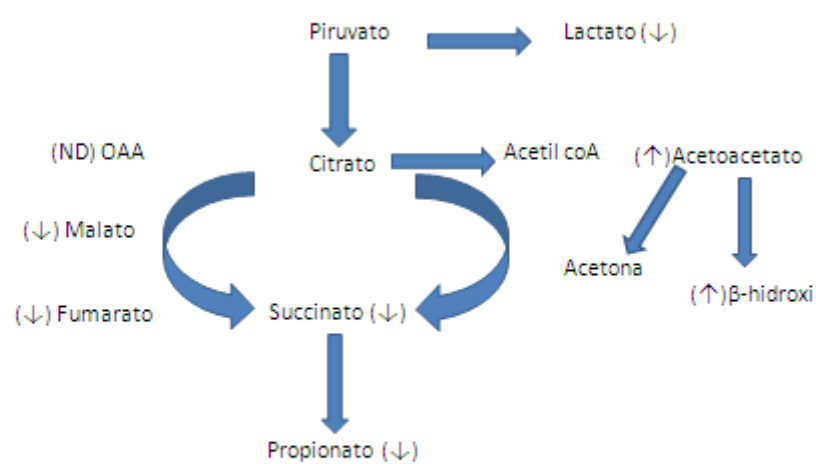
Praziquantel 0,03



Praziquantel 0,06



Albendazol 0,05



Albendazol 0,075