



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

SARAH BUZAIM LIMA

Avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica em modelo experimental de cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps* nas linhagens BALB/c convencional e deficiente para o gene de IL-4

**Goiânia
2014**

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

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação

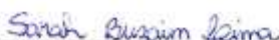
Nome completo do autor: Sarah Buzaim Lima

Título do trabalho: Avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica em modelo experimental de cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps* nas linhagens BALB/c convencional e deficiente para o gene de IL-4

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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


Assinatura do (ã) autor (a)

Data: 28 / 07 / 2016

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.

SARAH BUZAIM LIMA

Avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica em modelo experimental de cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps* nas linhagens BALB/c convencional e deficiente para o gene de IL-4

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

**Goiânia
2014**

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

Buzaim Lima, Sarah

Avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica em modelo experimental de cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps* nas linhagens BALB/c convencional e deficiente para o gene de IL-4 [manuscrito] / Sarah Buzaim Lima. - 2014.

xiv, 66 f.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014. Bibliografia. Anexos.

1. teníase-cisticercose. 2. cisticercose subcutânea. 3. granuloma. 4. Interleucina-4. 5. *Taenia crassiceps*. I. Lino Junior, Ruy de Souza, orient. II. Título.

CDU 639.09

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

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Sarah Buzaim Lima

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

Membros:

1. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

2. Prof. Dra. Mara Silvia Carvalhaes

3. Profa. Dra. Júlia Miranda Moraes

Data: 06/08/2014

*Ao meu Deus, que me concede o fôlego de vida para enfrentar os desafios diários.
Aos meus pais Paulo e Lucidê e ao meu irmão Isaac pelo amor e apoio incondicional,
por serem meus motivos para vencer.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, meu Tudo. Ele tem me dado oportunidade de crescer da melhor forma, através dos desafios. Ele é o motivo, a inspiração. A Ele toda glória e honra.

Aos meus pais Paulo Roberto e Lucidê, e ao meu irmão Isaac pelo amor e carinho. Vocês são meus incentivos diários para superar meus limites e acreditar que é possível tornar os sonhos reais.

Ao meu tio-pai Maurizzac pelo amor e encorajamento, e pelas orações que me fortalecem sempre. À minha avó Geralda e aos meus avós Sebastião e Cacilda pelo amor e carinho. À minha família querida pelo apoio e incentivo, pelos momentos inesquecíveis juntos. À minha cunhada Nara pelo apoio e amizade.

À Igreja Assembléia de Deus Sol da Justiça, aos meus Pastores Cíntia Mara e Maurício Tibúrcio e demais intercessores pelas orações.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior pela confiança. Por ter me aceito no laboratório, por me permitir crescer tanto como profissional quanto como pessoa. Pela gentileza, paciência e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira pela inestimável colaboração científica, pela disposição ao ensinar, e por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À minha querida colega Vânia Beatriz Lopes pela amizade e companheirismo, pela agradável convivência, pela ajuda nos experimentos, pelo conhecimento, críticas e sugestões na realização deste trabalho.

Ao meu querido amigo Hânstter Hállison Alves Rezende pelo incentivo e apoio. Sua amizade é muito especial para mim, é um prazer enorme tê-lo participando das minhas vitórias.

À minha querida “aluna” de monografia Raísa Melo Lima com quem tive a oportunidade de conviver e acompanhar, aprender e ensinar.

À Msc. Aline de Araújo Freitas por me ceder suas anotações e sempre colaborar nas dúvidas.

Às Prof^{as} Dr^{as} Mara Rúbia Celes, Flávia Oliveira, Eneida Vêncio, Silvia Helena Rabelo, e Liliana Borges, pelas oportunidades de aprendizado, pela contribuição científica dispensada durante as aulas de Patologia, e pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À Dr^a Fátima Ribeiro Dias, ao Dr. Vicente Raul Chavarria Irusta e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo crescimento científico proporcionado.

Aos colegas da Patologia Hidelberto, Marcelo, Íria, Janaina, Karla pela amizade, convivência e troca de experiências.

Ao Laboratório de Citocinas e Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro, especialmente aos colegas Carolina Fraga, Alexandre, Diego, Marco Vítor, Lohane, Clayson, pelo carinho e amizade.

À Prof^a Dr^a Marina Clare Vinaud pela amizade e oportunidade de contribuir em outros projetos.

Aos Alunos do Programa Jovens Talentos e PIVIC, em especial Izabella e Isabel pelo período de aprendizado e convivência.

Aos Programas de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública e em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro pelo crescimento científico proporcionado durante a conclusão dos créditos e nas demais atividades científicas propostas.

Aos membros da Banca de Qualificação pela contribuição científica a esse trabalho.

Ao Marco, Marly, Iraci, Linho e demais funcionários do Biotério pelo auxílio no cuidado com os animais e com o ambiente de trabalho.

Ao José Clementino de Oliveira Neto, à Kariny Vieira Soares e aos demais funcionários do IPTSP pelo auxílio, disposição e eficiência.

À Revista de Patologia Tropical, especialmente ao Prof. Dr. Alejandro Luquetti, pela confiança e oportunidade de crescimento científico.

Ao Laboratório de Patologia Experimental por ceder os equipamentos e os reagentes para que este trabalho fosse realizado.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, por proporcionar a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Complexo teníase-cisticercose	1
1.1.1 Biologia do parasito	1
1.1.2 Epidemiologia e manifestações clínicas	2
1.2 <i>Taenia crassiceps</i> : biologia e aplicabilidade experimental	4
1.3 Resposta inflamatória e inflamação crônica granulomatosa contra helmintos	7
1.4 Resposta inflamatória contra helmintos em estudos experimentais	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 MÉTODOS	17
4.1 Animais	17
4.2 Manutenção do ciclo experimental e inóculo dos camundongos BALB/c convencionais e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	19
4.3 Eutanásia e destino dos animais pós-experimentação	19
4.4 Análise morfológica e morfométrica	20
4.5 Cultura de esplenócitos para dosagem de citocinas por ELISA a partir dos sobrenadantes de cultura	21
4.6 Análise estatística	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Análise morfológica e morfométrica	25
5.2 Concentração das citocinas, IL-4, IFN γ , IL-10 e IL-13 a partir do sobrenadante de cultura de esplenócitos	41
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO - Parecer CEUA/UFG N.076/12	64

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1	Ciclo Biológico de <i>Taenia crassiceps</i> ; com hospedeiros definitivos (canídeos) e hospedeiros intermediários e/ou acidentais (roedores, cães, gatos e humanos)	05
Figura 2	Macroscopia do cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	06
Figura 3	Resposta imune contra <i>Taenia crassiceps</i>	13
Figura 4	Caixas para alojamento dos animais	18
Figura 5	Animais adaptados ao ambiente enriquecido durante o experimento ...	18
Figura 6	Macroscopia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO após a infecção com <i>Taenia crassiceps</i>	28
Figura 7	Fotomicrografia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 07 dias após a infecção	35
Figura 8	Fotomicrografia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 30 dias após a infecção	36
Figura 9	Fotomicrografia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 60 dias após a infecção	37
Figura 10	Fotomicrografia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 90 dias após a infecção	38
Figura 11	Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 07, 30, 60 e 90 dias após a infecção	40
Figura 12	Produção de IL-4 em esplenócitos de camundongos BALB/c <i>Wild-type</i> com cisticercose subcutânea por <i>Taenia crassiceps</i>	43
Figura 13	Produção de IFN γ em esplenócitos de camundongos BALB/c <i>Wild-type</i> (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por <i>Taenia crassiceps</i>	44
Figura 14	Produção de IL-10 em esplenócitos de camundongos BALB/c <i>Wild-type</i> (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por <i>Taenia crassiceps</i>	45
Figura 15	Produção de IL-13 em esplenócitos de camundongos BALB/c <i>Wild-type</i> (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por <i>Taenia crassiceps</i>	46
Tabela 1	Aspectos macroscópicos dos processos patológicos gerais na	ix

	interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	27
Tabela 2A	Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 07 dias de infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	31
Tabela 2B	Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 30 dias de infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	32
Tabela 2C	Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 60 dias de infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	33
Tabela 2D	Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 90 dias de infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	34
Tabela 3	Quantificação de colágeno em porcentagem no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	39

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
cm	Centímetros
DAI	Dias após o inóculo
DAMP	Moléculas-padrão associadas a dano tecidual (do inglês, <i>Damage-Associated Molecular Pattern Molecules</i>)
DCs	Células Dendríticas (do inglês, <i>Dendritic cells</i>)
DO	Densidade Ótica
EA	Enriquecimento Ambiental
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
Fc	Porção cristalizável do anticorpo, que se liga aos receptores
HE	Hematoxilina e eosina
HIV/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IFN γ	Interferon <i>gama</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-4-KO	Animais deficientes para o gene que codifica a citocina IL-4 (do inglês, <i>Knockout</i>)
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
M	Molar
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Micromolar
N	Normal
NCC	Neurocisticercose
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Original de Raposas (do inglês, <i>Original Fox</i>)

PAMP	Moléculas-padrão associadas a patógenos (do inglês, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMNs	Polimorfonucleares Neutrófilos
PS	Picro-sírius
RPMI	Meio de cultura desenvolvido por <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	São Paulo
STAT	Via de sinalização STAT (do inglês, <i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i>)
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
TA	Temperatura Ambiente
Th	Linfócitos T auxiliar (do inglês, <i>T helper</i>)
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês, <i>T helper 1</i>)
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2 (do inglês, <i>T helper 2</i>)
TGFβ	Fator de transformação do crescimento <i>beta</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
Tregs	Células T reguladoras
UFG	Universidade Federal de Goiás
WT	Animais convencionais (do inglês, <i>Wild Type</i>)

RESUMO

As parasitoses, consideradas endêmicas em países em desenvolvimento, são um problema relevante de saúde pública. Cerca de 50 milhões de indivíduos no mundo estão infectados pelo complexo teníase-cisticercose. Portanto, fatores biológicos envolvidos na suscetibilidade do hospedeiro frente às parasitoses devem ser investigados, dada a relevância dessas infecções para a saúde pública no Brasil e no mundo. Como demonstrado na literatura, a Interleucina-4, principal citocina da resposta Th2, tem um importante papel na resposta imune contra parasitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação desta citocina na patogênese da cisticercose subcutânea comparando-se a resposta inflamatória resultante da infecção em camundongos BALB/c convencionais e BALB/c deficientes para o gene da Interleucina-4 (IL-4-KO). Utilizando um modelo experimental de infecção no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*, foram avaliados parâmetros macroscópicos e microscópicos da lesão e perfil de citocinas em cultura de esplenócitos dos animais, visando caracterizar e comparar a resposta inflamatória local e sistêmica na infecção. Observou-se durante os dias experimentais o desenvolvimento de resposta inflamatória crônica granulomatosa nos animais convencionais com presença de infiltrado inflamatório macrofágico e linfoplasmocitário, e nos IL-4-KO, macrofágico e polimorfonuclear. Animais convencionais apresentaram um padrão de resposta misto, com produção inicial aumentada de *Interferon gama* (IFN γ) - resposta Th1, que evoluiu para a cronicidade com uma resposta Th2 predominante e presença de IL-10, modulando a resposta inflamatória e favorecendo a instalação do parasito. Nos animais IL-4-KO observou-se destruição parcial dos parasitos já nos primeiros dias de infecção, com aumento da produção de IFN γ , resposta Th1 mais acentuada; a co-expressão de IL-10 nesses animais inibiu a resposta Th1 acentuada e contribuiu para persistência da infecção. Fibrose e reparação tecidual não estiveram comprometidas durante os dias experimentais. Além disso, animais IL-4-KO infectados apresentaram produção espontânea de IL-13 maior que os convencionais aos 30 dias de infecção, contribuindo para participação da resposta Th2 na infecção. A deficiência de IL-4 direcionou a inflamação para um maior potencial microbicida, destruição parcial dos parasitos já nos primeiros dias de infecção, e redução significativa de eosinófilos.

Palavras chaves: teníase-cisticercose, cisticercose subcutânea, granuloma, imunopatologia, Interleucina-4, *Taenia crassiceps*.

ABSTRACT

The parasitary diseases which are considered endemic in developing countries are a relevant public health problem. Around 50 million people in the world are infected by the teniasis-cysticercosis complex. Therefore, biological factors involved in the host susceptibility to parasitary diseases should be investigated due to the relevance of these infections in public health both in Brazil and in the world. As demonstrated by the literature, Interleukin-4, the main Th2 cytokine, has an important role in the immune response against parasites. The aim of this study was to evaluate the role of this cytokine in the subcutaneous cysticercosis pathogenesis through the comparison of the inflammatory responses in conventional BALB/C mice infection and in Interleukin-4 deficient BALB/C mice (IL-4 KO). An experimental model of subcutaneous infection with *Taenia crassiceps* cysticerci was used and macroscopic and microscopic parameters of the injury, cytokines profiles in splenocytes cultures from the infected animals from both types of BALB/c mice were evaluated to compare the local and systemic inflammatory response to the infection. During the experimental days the development of the chronic granulomatous inflammatory response was observed in the conventional animals with presence of macrophagic and lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate and in the IL-4-KO animals with macrophages and polymorphonuclear cells in the inflammatory infiltrate. Conventional animals presented a mixed immune response pattern with an initial increase of IFN γ , which a Th1 cytokine, and evolved to chronicity with predominance of Th2 response and presence of IL-10 which modulates the immune response and favors the parasite infection. In the IL-4-KO animals it was possible to observe a partial destruction of the parasites in the first days of infection with increase in the Interferon gamma (IFN γ) production which is part of a Th1 accentuated response also the co-expression of IL-10 in these animals inhibited the accentuated Th1 response and contributed to the persistence of the infection. Fibrosis and tissue repair were not compromised in these animals. Furthermore, infected IL-4-KO animals presented a spontaneous production of IL-13 in higher concentrations than the conventional animals at 30 days of infection which contributed to the role of the Th2 immune response against the infection. The IL-4 deficiency directed the inflammation towards a greater microbicidal potential, partial destruction of the parasites in the first days of infection and significant reduction of eosinophils.

Key words: teniasis-cysticercosis, subcutaneous cysticercosis, granuloma, immunopathology, interleukin-4, *Taenia crassiceps*.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Complexo teníase-cisticercose

1.1.1. Biologia do parasito

O complexo teníase-cisticercose é uma zoonose clássica, reconhecida desde a antiguidade. Os egípcios e gregos já identificavam como vermes intestinais e a tratavam com sementes de abóboras. Em 1558, Rumler foi o primeiro a comunicar um caso de cisticercose humana descrevendo-a como um “tumor” da dura-máter de um indivíduo epiléptico. Malpighi, em 1698, descreveu em animais a natureza dos cistos e o escólex. Goeze em 1789 estudou os cisticercos de porco e identificou sua natureza helmíntica. Depois disso muitos avanços foram alcançados com o estudo conjunto da parasitologia e da veterinária (FLISSER; MADRAZO; DELGADO, 1997).

Entre os parasitos intestinais, os cestódeos estão envolvidos em algumas doenças negligenciadas que podem ser fatais e de difícil tratamento (TSAI et al. 2013). Podemos destacar algumas espécies de cestódeos que afetam o homem: *Taenia solium* (*T. solium*), *T. saginata*, *T. asiatica* e *T. crassiceps* do gênero *Taenia*, família *Taenidae*, classe *Cestoidea* e ordem *Cyclophyllidea*. O parasito de algumas destas espécies é responsável pela teníase humana. Suas respectivas formas larvais causam a cisticercose em suínos, bovinos e roedores, fase necessária para a continuidade do ciclo de vida do parasito. De forma acidental, o homem pode se infectar com ovos viáveis de *Taenia* e desenvolver a cisticercose assim como o hospedeiro intermediário (FLISSER, 1991; CAMPBELL et al. 2006; JEON, EOM, 2006; ALE et al. 2014).

A *T. solium*, espécie mais frequentemente diagnosticada em humanos, causa duas formas diferentes de infecção: a teníase, que é resultante da presença do parasito no intestino delgado, e a cisticercose, marcada pela presença do estágio larval (cisticercos) nos tecidos do indivíduo. Na teníase o homem é o hospedeiro definitivo, adquirindo a infecção a partir da ingestão de carne mal cozida que contenha larvas viáveis de *T. solium*. Desenvolvendo o parasito no intestino delgado, o indivíduo pode apresentar dores abdominais, perda de peso, náuseas, debilidade, constipação, diarreia e flatulência (FLISSER, 1991; GARCÍA et al. 2003).

O parasito se desenvolve no intestino e libera proglótides repletas de ovos nas fezes, que contaminam água ou alimentos e podem atingir o hospedeiro intermediário suíno, dando continuidade ao ciclo pela forma larval, e/ou contaminando

outros indivíduos de forma esporádica (FLISSER, 1991; PITELLA, 1997; TAKAYANAGUI & LEITE, 2001; GARCÍA et al. 2003).

A cisticercose humana por *T. solium* ocorre de forma acidental por via fecal-oral, pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com ovos viáveis de *T. solium* eliminados nas fezes de portadores de teníase, e disseminados no ambiente, por exemplo em água para irrigação contaminada com água de esgoto, na utilização de fezes contaminadas como adubo, entre outros. Outras fontes de infecção relacionadas a maus hábitos higiênicos são manipuladores de alimento, e o próprio portador de teníase que também pode se auto-infectar (ACHA & SZIFRES, 1986; FLISSER, 1991; PITELLA, 1997).

A forma larval dos parasitos pode persistir de forma assintomática em um hospedeiro humano por décadas; e quando é diagnosticada, a doença muitas vezes está em um estágio avançado em que a cirurgia não é mais uma opção (FLISSER, 1991; TSAI et al. 2013).

O complexo teníase-cisticercose tem grande importância tanto para a saúde humana quanto animal. A neurocisticercose (NCC), uma das formas mais graves no homem, é uma doença debilitante crônica; já em animais de produção, a carne imprópria para o consumo torna a doença um prejuízo à economia que envolve a sua comercialização (WHO, 2011).

1.1.2 Epidemiologia e manifestações clínicas

As helmintoses estão entre as parasitoses que ainda afetam populações humanas em diversas regiões do mundo, particularmente as marginalizadas, de baixa renda e com recursos limitados. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas nos países em desenvolvimento nas regiões da África Subsaariana, Ásia e América Latina, estão infectadas com uma ou mais espécies de helmintos. Fatores como a região, as condições de saneamento básico, o nível socioeconômico, o grau de escolaridade, a idade e os hábitos de higiene da população influenciam a frequência de parasitoses intestinais (MACHADO et al. 1999; ANDRADE et al. 2010; LUSTIGMAN et al. 2012; WHO, 2013).

A morbidade causada pelas parasitoses, somada à pobreza, à diminuição da produtividade e ao desenvolvimento socioeconômico inadequado, contribui para manter um ciclo vicioso associado à doença. Essas infecções podem comprometer ainda mais a

saúde dos indivíduos quando associadas a outras condições, tais como malária e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/SIDA) (WHO, 2013).

A cisticercose constitui um grave problema de saúde pública e funciona como marcador socioeconômico juntamente com outras doenças parasitárias, aliado às condições sanitárias e culturais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose está entre as 17 doenças tropicais consideradas negligenciadas, e a cisticercose por *T. solium* pertence ao subgrupo das oito zoonoses endêmicas negligenciadas; cerca de 50 milhões de pessoas estão infectadas no mundo pelo complexo teníase-cisticercose, sendo que destas, cerca de 80% vivem em países em desenvolvimento. A cisticercose é uma doença erradicada em muitas regiões, porém ainda frequente nas Américas Central e do Sul, China e Índia. A provável explicação é a falta de sistematização de investimentos de atenção básica à população (AGRAWAL, 2012; TSAI et al. 2013; WHO, 2013; MABLESON et al. 2014).

No Brasil, a NCC possui elevada frequência nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás. A prevalência populacional, contudo, não é conhecida pela ausência de notificação da doença. Embora a Portaria 1100 do Ministério da Saúde, de 24/05/1996, estabeleça a implantação da notificação compulsória do complexo teníase/cisticercose, apenas os Estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e a localidade de Ribeirão Preto (SP) implantaram programas de combate e controle da teníase/cisticercose (TAKAYANAGUI et al. 1996; PFUETZENREITER & ÁVILA-PIRES, 2000; AGAPEJEV, 2003; IASBIK et al. 2010).

As manifestações clínicas da cisticercose dependem da localização, do tipo morfológico, do número de larvas que se desenvolvem no indivíduo, do estágio de desenvolvimento dos cisticercos e da resposta imunológica do hospedeiro (PITELLA, 1997; CHIMELLI, LOVALHO, TAKAYANAGUI, 1998; AGRAWAL, 2012).

O cisticercos de *T. solium* possui um tropismo de causa desconhecida pelo Sistema Nervoso Central (SNC), olhos, músculo-esquelético e tecido subcutâneo. O SNC é o local de pior prognóstico e evolução da doença, e a infecção subcutânea é muitas vezes negligenciada por não causar sinais e sintomas graves (CAIXETA, L.; CAIXETA, M.; ALMEIDA-NETO, 2004; UTHIDA-TANAKA et al. 2004; KRAFT, 2007; AGRAWAL, 2012).

Cisticercos viáveis causam pouca ou nenhuma inflamação, diferentemente de cisticercos em degeneração que provocam no hospedeiro uma resposta inflamatória intensa, resultando em formação e consolidação de granuloma, com frequente

calcificação. Seres humanos e suínos desenvolvem alteração histopatológica semelhante na infecção por *T. solium* (MARZAL et al. 2014).

Os casos de cisticercose subcutânea apresentam-se frequentemente com inchaço nodular superficial. Após avaliação clínica, são triados por exames de imagem e rastreamento familiar com exames parasitológicos, citológicos e/ou sorológicos, e em sua maioria, são confirmados por biópsia, uma vez que a remoção cirúrgica, apesar de controversa, é o tratamento mais utilizado nesses casos, acompanhada de terapia anti-helmíntica (FLISSER, PÉREZ-MONTFORT, LARRALDE, 1979; UTHIDA-TANAKA et al. 2004; AGRAWAL, 2012; NIGAM & SHARMA, 2013; VIDAL, 2013; GUPTA, PANCHONIA, JAIN, 2014).

Vidal (2013) relatou um caso de cisticercose subcutânea por *T. solium* na face (nariz e região adjacente) de uma jovem de 19 anos. Gupta, Panchonia, Jain (2014) descrevem um caso de cisticercose em mama de uma mulher de 38 anos. Agrawal (2012) descreveu 21 casos confirmados de cisticercose em tecidos moles, distribuídos em músculos estriados em 11 casos (52,4%), seguido de olho em seis casos (28,6%), tecidos subcutâneos em dois casos (9,5%), língua e mama com um caso cada (4,7% cada). Calcificações de cisticercos em ovário e na pleura visceral também foram descritos (VIANNA; MACEDO; COSTA, 1991).

Existem ainda casos raros de cisticercose disseminada como o descrito por Verma, Sharma, Khurana (2011), de um indivíduo com 30 anos com lesões no cérebro, músculo esquelético e língua. Vaidya et. al (2013) relatam o caso de um homem de 27 anos envolvendo cérebro, pulmões, coração, órbita ocular, rosto, pâncreas, rim e baço.

Apesar de *T. solium* ser a principal espécie que acomete seres humanos, o uso de antígeno de cisticercos de *T. solium* para a pesquisa e estudo da cisticercose é complicado, principalmente pela dificuldade de extração dos cisticercos. Isso estimulou a procura por outras fontes, como o cisticercos de *T. crassiceps*. Estudos comprovam que parasitos deste gênero partilham epítomos importantes, o que atestaria a semelhança antigênica das espécies citadas e contribuiria para sua utilização em pesquisas (TOGORO, SOUZA, SATO, 2012).

1.2 *Taenia crassiceps*: biologia e aplicabilidade experimental

T. crassiceps é um helminto da família *Taenidae*, ordem *Cyclophyllidea* e classe *Cestoda*. Sua forma larval ou cisticercos possui diâmetro que varia de 4-5 mm, e é capaz de produzir inúmeros brotamentos na superfície de sua membrana. As formas

adultas de *T. crassiceps* parasitam o intestino delgado de canídeos, principalmente raposas (MAILLARD et al. 1998; WILLMS & ZURABIAN, 2010; FRANSSEN et al. 2014). A figura 1 resume o ciclo biológico desta espécie, com seus respectivos hospedeiros.

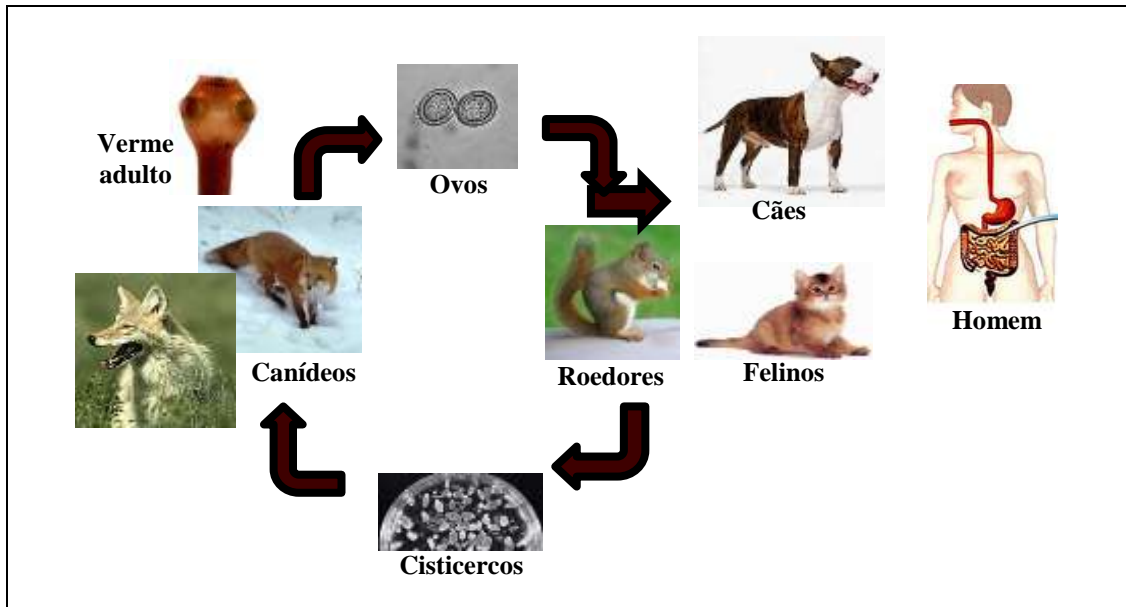


Figura 1 Ciclo Biológico de *Taenia crassiceps* - com hospedeiros definitivos (canídeos) e hospedeiros intermediários (roedores) e acidentais (cães, gatos e humanos). Adaptado de FREEMAN et al. 1962.

Além de animais selvagens, existem evidências de que o homem também pode ser hospedeiro deste parasito de forma acidental. Em hospedeiros intermediários e acidentais, estes últimos também chamados paratênicos, não foi relatada a cura espontânea. A cisticercose humana por *T. crassiceps* ocorre por meio da ingestão de ovos deste cestóide presente em água ou alimentos contaminados. Existem casos descritos na literatura de cisticercose no SNC e no subcutâneo em animais domésticos como cães e gatos ressaltando a importância destes na transmissão e incidência da cisticercose humana por *T. crassiceps* (DYER & GREEVE, 1998; MAILLARD et al. 1998; WUNSCHMANN et al. 2003).

Freeman e colaboradores (1973) relataram um caso de uma mulher que ingeriu ovos de *T. crassiceps* proveniente das fezes de seu cão doméstico, e desenvolveu cisticercose intraocular. Duong et al. (2006) relataram um caso de cisticercose na parede abdominal, sugestivos de *T. crassiceps*, em paciente imunocompetente. Porém, existe maior frequência de casos relatados de cisticercose

humana por *T. crassiceps* em indivíduos imunodeprimidos, como portadores de HIV/SIDA (CHERMETTE et al. 1995; FRANÇOIS et al. 1998; MAILLARD et al. 1998) ou acometidos por neoplasias como o linfoma (HELDWEIN et al. 2006).

Uma interessante característica de *T. crassiceps* é a sua capacidade, ou vantagem evolutiva, de reproduzir-se assexuadamente por meio de brotamento na fase larval. Essa característica permite que a fase larval se mantenha e colonize seus hospedeiros por longos períodos de tempo (WILLMS & ZURABIAN, 2010; PÉON; ESPINOZA-JIMÉNEZ; TERRAZAS, 2013). A figura 2 mostra em detalhe os diferentes estágios do cisticerco de *T. crassiceps*.



Figura 2 Macroscopia do cisticerco de *T. crassiceps*. **A.** Cisticerco em estágio inicial; **B.** Cisticerco em estágio larval. **C.** Cisticerco em estágio final. Adaptado de VINAUD, LINO, BEZERRA, 2007.

A semelhança antigênica das espécies tem sido demonstrada por diversos estudos. Entre eles destaca-se o do antígeno alternativo para *T. solium* a partir de *T. crassiceps*, realizado na Alemanha e publicado em 1989. Os autores purificaram o fluido vesicular de *T. crassiceps* por cromatografia de afinidade, utilizando soro de coelho imunizado com *T. solium*. A fração purificada apresentou nove antígenos de reatividade cruzada com *T. solium*. Nas técnicas, como ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), para detecção de anticorpos em amostras séricas de pacientes com diagnóstico confirmado de NCC, a sensibilidade foi comparável com o antígeno homólogo (fluido vesicular de *T. solium*), indicando o potencial de aplicação do antígeno heterólogo purificado para fins diagnósticos (KUNZ et al. 1989).

Várias são as vantagens, além da semelhança antigênica, para a utilização de *T. crassiceps* em estudos: a produção é de baixo custo, boa reprodutibilidade e ocupa pouco espaço nos laboratórios. Ao contrário, infecções experimentais em suínos com

ovos de *T. solium* poderiam trazer graves consequências ambientais ao disseminar ovos com alto potencial infectante. Assim, a multiplicação em laboratório e em condições padronizadas de cisticercos de *T. crassiceps* em camundongos abre boas perspectivas para a produção de antígeno heterólogo em larga escala; além disso modelos experimentais são viabilizados e facilitam o estudo e a compreensão da imunopatologia da infecção, a fim de se avaliar a resposta inflamatória local e sistêmica do hospedeiro frente a este patógeno (VAZ et al. 1997; GUSSO, 2000).

Como modelo experimental para estudo da cisticercose humana, a fase larvária de *T. crassiceps* pertencente à cepa Original de Raposas (ORF - do inglês, *Original Fox*) é utilizada atualmente, por meio da inoculação dos cisticercos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c isogênicos sendo mantidos indefinidamente por inoculações subsequentes a cada 90 dias de infecção. Cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF não possuem escólex, não tendo, portanto, capacidade de desenvolver o helminto adulto (VAZ et al. 1997; WILLMS & ZURABIAN, 2010; FREITAS et al. 2012; MATOS-SILVA et al. 2012; MOURA et al. 2013).

1.3 Resposta inflamatória e inflamação crônica granulomatosa contra helmintos

O processo inflamatório é formado por eventos que ocorrem de forma sequencial e/ou simultânea; é uma reação dos tecidos a um agente agressor. Um agente inflamatório, através de moléculas sinalizadoras de agressão do tipo moléculas-padrão associadas a patógenos (PAMP - do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou moléculas-padrão associadas a dano tecidual (DAMP - do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*), induz a liberação de mediadores inflamatórios, que alteram a microcirculação facilitando a saída de líquidos e células do sangue para o interstício, e a esse processo denomina-se inflamação (KONO & ROCK, 2008).

Após o contato com o agente agressor, inicialmente ocorrem fenômenos irritativos e modificações vasculares locais, seguidos de exsudação plasmática e celular, que culminam com alterações teciduais, lesões degenerativas e necróticas. Mecanismos anti-inflamatórios naturais atuam desde a fase inicial do processo inflamatório e eles são essenciais na progressão para cura ou cronificação do processo (BOGLIOLO, 2011).

A exsudação plasmática promove a saída de diversas moléculas como peptídeos antimicrobianos, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e outras substâncias que atuam na morte de patógenos. O sistema complemento também

participa, e responde via clássica ou alternativa, de forma imediata a partículas microbianas, com efeitos como opsonização e quimiotaxia, entre outros (BANGERT, BRUNNER, STINGL, 2011).

Dependendo da natureza do agente agressor, o sistema imune pode produzir uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e quimiocinas que atraem subpopulações de células imunes da circulação para o local de lesão ou invasão do patógeno (TAY et al. 2014).

Várias células inflamatórias são atraídas para o local da inflamação; entre estas células estão os fagócitos mononucleares. Estudos demonstram que em tecidos que tem contato com o meio externo, como a derme, os fagócitos constituem mais de 60% da população de células residentes (DUPASQUIER et al. 2004). Os macrófagos produzem grandes quantidades de citocinas em resposta a microorganismos, incluindo Interleucina-1(IL), IL-6, Fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α), IL-8, IL-12, IL-10 e Fator de transformação do crescimento *beta* (TGF β) (BANGERT, BRUNNER, STINGL, 2011). Algumas destas citocinas são responsáveis por muitos dos sinais clínicos de doenças infecciosas e inflamatórias, e contribuem para a quimiotaxia de outras células para o local da agressão (BOGLIOLO, 2011).

Por apresentarem vários receptores quimiotáticos, os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) são atraídos por citocinas de macrófagos e células dendríticas (DCs) residentes, e após ativação passam a produzir quimiocinas que atraem outras células para o local da inflamação. Os PMNs possuem atividade microbicida (SERHAN et al. 2007; BANGERT, BRUNNER, STINGL, 2011).

Por ação direta ou indireta do agente inflamatório, ocorrem alterações no local inflamado, como degeneração e necrose. Populações de PMNs e macrófagos são recrutadas através de mediadores pré-formados e metabólitos reativos como quimiocinas, citocinas e anticorpos, e atuam no reparo tecidual (TAYLOR, WERF, MAIZELS, 2012).

Entre os fatores que interferem na instalação e progressão da resposta inflamatória estão a qualidade e a quantidade do agente inflamatório, o estado do sistema imune e o estado funcional do organismo agredido. O processo inflamatório encaminha-se para cronificação quando os eventos resolutivos não são eficientes, ocorre um desequilíbrio entre mecanismos pró e anti-inflamatórios, falha na eliminação ou persistência do fator causal e/ou surgem fenômenos de autoagressão imune (BOGLIOLO, 2011).

A inflamação crônica é caracterizada por região de intensa atividade inflamatória, presença de exsudato celular mononuclear e fenômenos alterativos com áreas de resolução e reparação tecidual, como angiogênese e fibrose. Em algumas inflamações, o exsudato se organiza em forma circunscrita, denominada granuloma (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; BOGLIOLO, 2011).

Granulomas provocados por agentes inflamatórios imunogênicos, como ovo de *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) por exemplo, caracterizam-se por camadas concêntricas de células inflamatórias, principalmente macrófagos, formando coroas periféricas em torno do agente inflamatório (BOGLIOLO, 2011). Com o passar do tempo, os granulomas apresentam fibroblastos e uma cápsula de tecido conjuntivo (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

A imunidade celular com diferenciação de linfócito T auxiliar (Th – do inglês *T helper*), principalmente Th1 ou Th2 está envolvida na gênese dos granulomas, com influência de citocinas e quimiocinas e de mecanismos efetores da resposta imune (BOGLIOLO, 2011).

Para destruir e eliminar helmintos, o sistema imune possui um conjunto de mecanismos efetores especializados em torno da via Th2. A sinalização por IL-4 para a ativação do fator de transcrição STAT6 (Via de sinalização STAT - do inglês, *Signal Transducers and Activator of Transcription*) é o principal mecanismo de diferenciação de células Th *naive* em células Th2 (DENT et al. 1998; MARTINEZ, HELMING, GORDON, 2009; LUZINA et al. 2012).

Esse fenótipo Th2 está associado à produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, secreção de Imunoglobulina (Ig) E e IgG4 e ativação de células efetoras, como eosinófilos (LÓPEZ-MORENO, 2002; WANG, CAO, SHI, 2008; BOURKE, MAIZELS, MUTAPI, 2011). As IL-4 e IL-13 medeiam a resposta imune caracterizada por eosinofilia, basofilia, mastocitose, ativação de mudança de classe de células B, e produção de anticorpo (MARTINEZ, HELMING, GORDON, 2009). Os anticorpos IgE se ligam à superfície dos helmintos, e os eosinófilos então aderem por meio de receptores Fc (receptores que se ligam a região constante da IgE), sendo ativados para secretar grânulos com enzimas que destroem os parasitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Estudos em humanos e modelos experimentais têm demonstrado que os eosinófilos possuem funções que contribuem na indução da resposta Th2, diferenciação e recrutamento de células efetoras Th2 para os sítios de infecção: os eosinófilos são

fontes de citocinas indutoras de Th2 (IL-4 e IL-13), precocemente na resposta inflamatória dentro dos tecidos e linfonodos; secretam quimioatrativos específicos que recrutam células efetoras Th2 para tecidos inflamados; entre outras funções (SPENCER & WELLER, 2010).

As células Th2 produzem citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-21 que regulam sua própria subpopulação e ainda outras subpopulações, que contribuem com níveis significativos destas mesmas citocinas, causando uma amplificação no sinal de resposta. Por outro lado, também na resposta a helmintos, observa-se imunossupressão da resposta imune, incluindo a secreção de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- β e expansão de populações de células reguladoras, particularmente células T reguladoras (Tregs) (BOURKE, MAIZELS, MUTAPI, 2011).

Respostas imunes a infecções por helmintos via Th2 também pode causar efeitos prejudiciais ou danos ao hospedeiro, por exemplo, mediando respostas fibróticas patológicas em infecções parasitárias crônicas. A supressão da resposta Th1 por uma exacerbada resposta Th2 é considerada relevante por atenuar danos causados pela resposta Th1 no hospedeiro, mas também pode levar à diminuição da imunidade Th1 protetora contra infecções simultâneas causadas por patógenos bacterianos, virais e parasitários (WANG, CAO, SHI, 2008).

A imunorregulação desempenha um papel fundamental na sua estratégia de sobrevivência dos helmintos (TAYLOR, WERF, MAIZELS, 2012). Os helmintos são considerados imunorreguladores, pois induzem respostas Th2 e estimulam outras células da imunidade inata, que por sua vez, irão manter a população de células Th2 (ANTHONY et al. 2007; JACKSON et al. 2008).

Dois principais mecanismos de imunomodulação da resposta por helmintos são: a indução de perfil de resposta do tipo Th2, incluindo produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, além de produção de IgE e recrutamento de eosinófilos e mastócitos; e a geração de uma resposta reguladora com produção de agentes anti-inflamatórios como IL-10 e TGF β , e recrutamento de células Tregs e macrófagos alternativamente ativados (M2), que podem atuar suprimindo a resposta imune, prevenindo o dano tecidual (HARNETT, 2014).

O desenvolvimento e a sobrevivência do cisticerco dentro do hospedeiro também envolve mecanismos de evasão da resposta imune pelo parasito (SCIUTTO et al. 1995; SPOLSKI et al. 2002). Yan et al. (2014) identificaram no genoma de *T. solium* cerca de 200 sequências de proteases presentes relacionadas a fatores de virulência -

como potencial de invasão/entrada, migração no tecido e supressão de resposta imune do hospedeiro - e ao desenvolvimento do ciclo de vida do parasito. Muitos produtos secretados pelo parasito podem interferir na resposta imune, resultando um perfil anérgico ou tolerogênico, ou na tentativa de prevenir o surgimento de um perfil inflamatório Th1/Th17 (MCSORLEY, HEWITSON, MAIZELS, 2013).

IFN γ e IL-12 estão envolvidos na formação do granuloma tipo Th1, e IL-4, IL-10 e IL-13, no granuloma tipo Th2. Ambos os granulomas apresentam diferentes características morfológicas, uma vez que mediadores químicos e populações celulares diferentes participam em cada tipo de resposta. Quando a produção de IFN γ e IL-12 é menor, os granulomas são mais desorganizados, com menos fibrose e maior tendência à caseificação, do que aqueles em que há resposta Th1 mais intensa (BOGLIOLO, 2011).

De acordo com estudos anteriores as citocinas do tipo Th1 estão mais expressas no início da formação do granuloma (primeiro e segundo estágio). A partir do terceiro estágio tem-se a expressão de citocinas Th2 (IL4 e IL-10) em maior quantidade. Esses dados sugerem que primeiramente as citocinas Th1 destroem o parasito. Após a destruição do parasito, a IL-4 é expressa. Desta forma, a IL-4 pode desempenhar um papel de imunomodulação negativa da resposta inflamatória, evitando uma resposta exacerbada e diminuindo o dano tecidual (ROBINSON et al. 1997; MIN et al. 2004).

As citocinas produzidas em resposta à agressão, portanto, tem importante influência sobre o direcionamento da resposta imune, particularmente sobre o perfil de diferenciação de macrófagos. (BANGERT, BRUNNER, STINGL, 2011). A ativação de macrófagos é influenciada pelas citocinas do microambiente. Nas fases iniciais da inflamação e em inflamações crônicas, os macrófagos são estimulados por citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN γ – principal produto de células Th1, a aumentar sua capacidade fagocítica e de apresentação de antígeno, além de produção de mediadores pró-inflamatórios e tóxicos, população denominada macrófagos classicamente ativados (M1). No processo resolutivo da inflamação, citocinas como IL-10, 13 e 21, além de corticosteróides, resolvinas e outros mediadores induzem a síntese de fatores de resolução, remoção e reparo do dano tecidual, e ativam macrófagos à produção de fatores anti-inflamatórios envolvidos no reparo, do tipo M2 (GORDON, 2003; MOSSER & EDWARDS, 2008; MARTINEZ, HELMING, GORDON, 2009; LUZINA et al. 2012; MARTINEZ & GORDON, 2014).

Macrófagos M2 são células especializadas cujas funções incluem reparação de tecidos, eliminação de parasitos e regulação da inflamação. Na esquistossomose, eles

podem impedir o desenvolvimento de infecção grave na fase aguda, e por outro lado contribuem para fibrose hepática na fase crônica. M2 distingue-se de M1 pela presença de marcadores de superfície, como por exemplo o receptor de manose (CD206) e a expressão de substâncias como arginase-1, através de um mecanismo STAT6 dependente; acredita-se que essa enzima auxilia na reparação tecidual, pela sua atuação na síntese de prolina e poliaminas (LUZINA et al. 2012).

1.4 Resposta inflamatória contra helmintos em estudos experimentais

Terrazas et al. (1998) relatou que nas fases iniciais de cisticercose experimental por *T. crassiceps* ocorre uma resposta imune Th1 transitória, com níveis elevados de IL-2 e IFN γ , que está associada com uma baixa taxa de reprodução do parasito. À medida que a infecção progride, há uma resposta Th2 mais permanente, níveis elevados de IL-4, IL-6 e IL-10, associada com um aumento na taxa de reprodução do parasito. A ativação sequencial de respostas do tipo Th1 e Th2 na cisticercose murino parece favorecer à reprodução do parasito progressivamente, explicando a residência de longa data e a elevada carga parasitária em infecções crônicas.

Foi demonstrado *in vivo* que a resposta imune contra *T. crassiceps* mais tardiamente é mista (Th1 e Th2), com níveis elevados tanto de IFN- γ quanto de IL-4. Acredita-se que os parasitos empregam uma variedade de estratégias para evitar ou modificar a resposta imune do hospedeiro (SPOLSKI et al. 2000).

Mooney et. al (2000) observaram destruição imune de larvas de *T. crassiceps* na cavidade abdominal em animais previamente sensibilizados via subcutânea. As larvas injetadas por via intraperitoneal foram mortas por células hospedeiras, e houve diminuição na concentração de citocinas quantificadas a partir do lavado peritoneal, incluindo IFN γ , IL-4 e IL-10, nos camundongos que estavam destruindo as larvas durante a infecção secundária, quando comparados com o controle apenas sensibilizado.

Como mostra a Figura 3, a resposta Th1 inicial na infecção por *T. crassiceps* é rapidamente substituída por uma resposta Th2 a partir da terceira ou quarta semana de infecção, que é acompanhada por uma mudança no fenótipo de macrófagos classicamente para alternativamente ativados. Além disso, um aumento na carga parasitária pode ser observado quando a população AAM e a resposta Th2 são estabelecidas (PÉON, ESPINOZA-JIMENES, TERRAZAS, 2013).

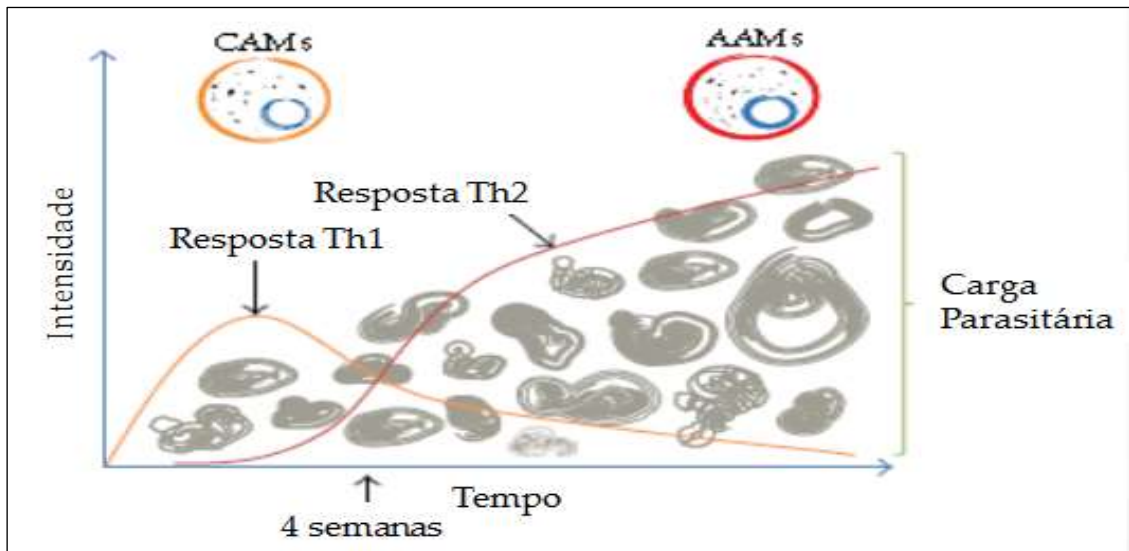


Figura 3 Resposta imune contra *T. crassiceps*. Legenda: CAMs: macrófagos classicamente ativados; AAMs: macrófagos alternativamente ativados. Adaptado de PÉON, ESPINOZA-JIMENES, TERRAZAS, 2013.

Em camundongos C57BL/6 com cisticercose subcutânea por *T. crassiceps* Freitas et al. (2012) observaram a formação de granuloma composto por macrófagos e neutrófilos envolvendo os cisticercos; estes animais tiveram aumento na concentração sérica de IFN γ durante a infecção, e aumento de IL-4 durante o período de transição entre as fases inicial e tardia da infecção. O aumento da resposta Th1, pela produção de IFN γ , parece ter contribuído para a destruição do parasito e controle da infecção.

Com relação ao papel da IL-4 em infecções por helmintos, estudos em infecção experimental com *S. mansoni* demonstraram que a IL-4 direciona o desenvolvimento de resposta granulomatosa, sendo responsável por determinar o tamanho do granuloma, induzindo a proliferação de células Th2 produtores de citocinas IL-5 e IL-13 (BURKE et al. 2009).

Ainda em infecções por *S. mansoni*, IL-4 e IL-13 induzem ativação alternativa de macrófagos, que ajudam a controlar o desenvolvimento de um perfil pró-inflamatório do tipo Th1 e/ou Th17 subjacente ao processo inflamatório já existente (ANTHONY et al. 2007).

Flamme, Patton, Pearce (2001) observaram camundongos deficientes em IL-4 com uma esquistossomose fatal grave quando comparados a camundongos convencionais, possivelmente pelo aumento da expressão de IFN γ , e consequente indução na síntese de NO.

Visando analisar o papel da IL-4 na cisticercose subcutânea e a sua participação na resposta inflamatória, semelhante ao já descrito para outras infecções,

nosso estudo utilizou uma linhagem de camundongos convencional e outra deficiente para o gene de IL-4.

2 JUSTIFICATIVA

O modelo proposto neste projeto oferece condições para estudo da cisticercose no tecido subcutâneo de forma experimental com possível aplicação à clínica humana, considerando a semelhança da repercussão da doença, com diferença apenas nas espécies do parasito. O estudo experimental possibilita o acompanhamento do local infectado e o desenvolvimento da resposta inflamatória ao longo do tempo, seja por métodos anatomopatológicos, imunohistoquímicos, entre outros, que permitam expressar dados relevantes da evolução da doença e da resposta imune frente ao parasito.

A cisticercose por *T. crassiceps*, mesmo em baixa frequência, tem-se mostrado muito relevante em pacientes imunodeprimidos, com relatos de casos em pacientes portadores de HIV/SIDA e neoplasia.

Tendo em vista que a IL-4 é a citocina de assinatura da resposta Th2, predominante na infecção por helmintos, utilizou-se duas linhagens de camundongos, BALB/c convencionais e deficientes para o gene de IL-4, a fim de analisar possíveis diferenças na resposta inflamatória entre as linhagens. Este estudo inclui-se à linha de pesquisa em Cisticercose Experimental, desenvolvida no Laboratório de Patologia Experimental do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Não seria viável realizar a pesquisa em humanos, uma vez que não é possível a infecção experimental e a retirada de fragmentos do subcutâneo nesses indivíduos para análise da resposta inflamatória esperada. Neste sentido, testes com animais de experimentação, quando conduzidos de forma ética, são bastante aceitos na literatura nacional e internacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar e comparar a resposta inflamatória local e sistêmica resultante da infecção no subcutâneo por cisticercos de *T. crassiceps* utilizando-se camundongos BALB/c convencionais e deficientes do gene de IL-4.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar processos patológicos gerais presentes no subcutâneo infectado, por análise anatomopatológica macro e microscópica.
- ✓ Avaliar a concentração das citocinas Interleucina-4, Interferon- γ , Interleucina-10 e Interleucina-13, que estão relacionadas ao processo inflamatório associado à infecção, a partir de sobrenadantes de cultura de esplenócitos.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

A realização deste projeto obedeceu às normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UFG), aprovado e protocolado pelo nº076/12.

Os animais foram manipulados sempre de forma cuidadosa e pelo pesquisador que possui treinamento apropriado para realização deste estudo e acompanhado por um Médico Veterinário. Foram utilizados 80 camundongos machos isogênicos das linhagens BALB/c, deficientes ou não do gene de IL-4 com oito a doze semanas de idade, pesando de 20 a 30 gramas, inicialmente mantidos em gaiolas apropriadas de 20 centímetros (cm) x 30 cm no Biotério do IPTSP/UFG. As matrizes dos camundongos deficientes para IL-4 foram doadas pela Dr^a Nancy Noben-Trauth (NIH, Bethesda, MD, USA).

Priorizando o bem estar dos animais, as gaiolas ficaram próximas, uma de frente para a outra. A luminosidade foi controlada por fotoperíodo de 12 horas; a temperatura, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar foram as do ambiente geral. Foram colocados 6 animais por gaiola, recebendo água e ração comercial autoclavada *ad libitum* para a espécie à vontade e as trocas das camas foram realizadas duas vezes por semana.

Visando otimizar a vivência dos animais, as gaiolas foram adaptadas com enriquecimento ambiental (EA), como observado nas figuras 5 e 6. Após o desmame, os animais foram transportados das gaiolas convencionais de 20 cm x 30 cm x 12 cm para caixas maiores de 40 cm x 30 cm x 20 cm, contendo estímulos cognitivos, sensoriais e motores, tais como rodas de pvc, iglus, rodas de exercício e diversos objetos de plástico, em diferentes cores e texturas. Esses objetos foram higienizados semanalmente com água e sabão neutro, e não compartilhados entre as demais gaiolas.

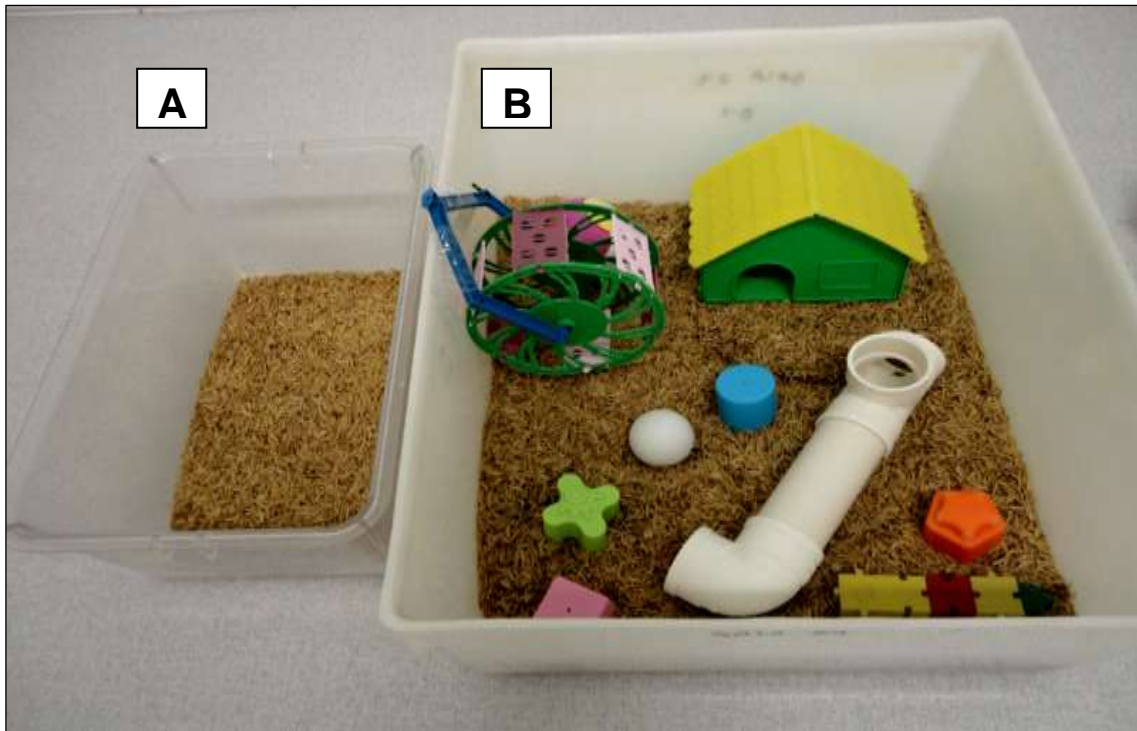


Figura 4 Caixas para alojamento dos animais. **A.** Caixa convencional de 20x30x12cm. **B.** Caixa de 40x30x20cm com enriquecimento ambiental.



Figura 5 Animais adaptados ao ambiente enriquecido durante o experimento.

Foram formados quatro grupos de camundongos, distribuídos aleatoriamente, contendo 20 camundongos em cada, totalizando 80 animais: Grupo 1 – camundongos BALB/c convencionais (WT, do inglês, *Wild Type*) infectados com cisticercos de *T. crassiceps*; Grupo 2 – camundongos BALB/c deficientes do gene do IL-4 (IL-4-KO, do inglês, *Knockout*,) infectados com cisticercos de *T. crassiceps*; Grupo 3 – camundongos BALB/c WT inoculados com solução salina estéril e; Grupo 4 – camundongos BALB/c IL-4-KO inoculados com solução salina estéril. Para cada período de estudo 7, 30, 60 e 90 dias após o inóculo (DAI) foram utilizados grupos contendo cinco animais cada, quantidade necessária para a análise estatística.

Os animais submetidos ao inóculo foram acompanhados por avaliação de dor e/ou sofrimento por um Médico Veterinário e, caso os animais apresentassem sintomatologia indicada por esses parâmetros, seriam eutanasiados. Para observar a frequência da dor foi utilizada a avaliação do comportamento desses animais na gaiola e no momento da manipulação, como por exemplo higiene pessoal, agressividade, postura e respostas ao manejo.

4.2 Manutenção do ciclo experimental e inóculo dos camundongos BALB/c convencionais e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 com cisticercos de *Taenia crassiceps*

A cepa ORF de *T. crassiceps* é mantida no Biotério do IPTSP-UFG, por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de oito a 12 semanas de idade, desde 2002, de acordo com Vaz et al. (1997).

Os camundongos BALB/c convencionais e BALB/c deficientes do gene de IL-4 foram inoculados com 10 cisticercos em fase inicial no subcutâneo da região dorsal, em um único ponto de inoculação. Os animais infectados foram inoculados 10 cisticercos em suspensão, com volume mínimo de 0,2mL de solução salina estéril. Os animais controles foram inoculados apenas com solução salina estéril (0,2mL) (FREITAS et al. 2012).

4.3 Eutanásia e destino dos animais pós-experimentação

Nos dias experimentais 7, 30, 60 e 90 DAI, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,5g/mL de solução de Xilazina a 2% e Cloridrato de Cetamina a 10%. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, para a coleta do subcutâneo de animais infectados, e do baço de animais

infectados e controle para análise subsequente. Este método de eutanásia foi escolhido por estar de acordo com os métodos previstos pela Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 1000 de 11 de maio de 2012, sendo este apropriado para a idade, espécie e peso dos animais e por provocar a morte do animal rapidamente diminuindo o estresse. O pesquisador foi treinado para a execução do método com segurança.

Após a eutanásia, esses animais foram preservados em freezer a -20°C, até o momento da incineração na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

4.4 Análise morfológica e morfométrica

A análise anatomopatológica foi realizada através do estudo morfológico, macro e microscópico, dos processos patológicos gerais presentes no subcutâneo, decorrentes da infecção pelos cisticercos de *T. crassiceps*. Para tais análises foi coletado o tecido subcutâneo adjacente ao local da implantação dos cisticercos, seguido da documentação fotográfica do mesmo por uma máquina fotográfica digital, em fundo escuro contendo uma régua milimetrada como referência.

Dentre os critérios para análise macroscópica utilizou-se: cálculo da área da lesão, presença de hemorragia, hiperemia, fibrose, inflamação aguda exsudativa purulenta, e translucidez ou opacidade da membrana. A área da lesão dos animais infectados foi feita a partir da média das imagens digitalizadas do grupo, registradas no momento da retirada das amostras, com auxílio do programa *Image J* (NIH, USA).

Uma vez coletado, o subcutâneo foi fixado em formaldeído tamponado a 10% (tampão-fosfato 10 mM, Potencial Hidrogeniônico (pH) 7,4) e processado em baterias de álcool e xilol para inclusão em blocos de parafina. Dos blocos foram obtidos cortes de 3 micrômetros (μm) de espessura em lâminas para microscopia, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e picro-sírius (PS) (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3B, Sirius red F3B-Bayer) com contra-coloração pela hematoxilina (por 1 minuto), para análise do colágeno.

Para a avaliação morfológica utilizou-se microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss). Para registro dos resultados, imagens foram capturadas através de uma câmera de alta resolução (Sony NEX-3K) adaptada a microscópio de luz (AxioLab, Carl Zeiss), e transmitidas ao computador.

A análise microscópica foi realizada aos 7, 30, 60 e 90 DAI, a fim de acompanhar a evolução da resposta inflamatória local (FREITAS et al. 2012). Nesta análise observou-se: 1. no parasito: sua presença ou ausência, suas fases de desenvolvimento, a integridade de suas membranas, a presença e intensidade do infiltrado inflamatório, e qual tipo celular predominante; 2. na interface parasito-hospedeiro: alterações da célula, alterações do interstício, alterações locais da circulação sanguínea, pigmentações patológicas, calcificação patológica, edema e inflamação. Os processos patológicos descritos foram classificados quando a presença e/ou intensidade, esta última nos níveis: discreta (com comprometimento de até 25% da área), moderada (de 26 a 50% da área) e acentuada (acima de 50 % da área) (LINO-JUNIOR et al. 2002; FREITAS et al. 2012).

Em todos os animais foi observada a formação de um granuloma, que foi classificado da seguinte forma: primário, caracterizado por agregados de macrófagos em torno do parasito; secundário, caracterizado por necrose central, circundada por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas; terciário, caracterizado por pouca necrose, infiltrado inflamatório e fibrose.

A análise da fibrose foi feita aos 07, 30, 60 e 90 dias de infecção de ambas as linhagens, a partir dos cortes de tecido infectado corados pelo picro-sírius e examinados sob luz polarizada, com objetiva de 40x. Os campos para quantificação do colágeno foram capturados por meio de uma câmera (Sony NEX-3K) acoplada ao microscópio; as imagens foram analisadas com o programa *Image J* (NIH, USA) e a quantificação foi expressa em percentagem de área ocupada. A quantificação do colágeno foi feita com uma média de 30 campos/lâmina em todos os animais, não sendo discriminados os tipos de colágeno durante a quantificação. A área total analisada por animal foi de aproximadamente 8.514.221,19 μm^2 , totalizando 42.571.105,95 μm^2 por dia experimental (5 animais/dia).

4.5 Cultura de esplenócitos para dosagem de citocinas por ELISA a partir dos sobrenadantes de cultura

O baço dos camundongos foi coletado em câmara de fluxo laminar, e transferido para uma placa de Petri estéril contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). O órgão foi macerado e as células em suspensão foram lavadas por centrifugação. As células foram ressuspensas em solução concentrada de lise para hemácias (TRIS HCl 17 micromolar (mM) e Cloreto

de Amônio 0,144 molar (M) em água milli-Q). As células foram lavadas com meio RPMI (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*) completo (RPMI 1640 (SIGMA) enriquecido com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 miligrama (mg) /mL de estreptomicina e 50mM de 2-mercaptoetanol), em seguida contadas em câmara de Neubauer com Azul de Tripán 1% para verificar a Viabilidade Celular; foram incubadas 5×10^6 células viáveis/mL em placa de cultura de tecido de 24 poços de fundo chato (CORNING, NY, EUA). A incubação foi feita por 48 horas em meio RPMI completo em estufa umidificada a 37 graus Celsius (°C) e 5% de gás carbônico. As células foram cultivadas com e sem adição de estímulo com Concanavalina A (ConA, SIGMA). Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -20°C até análise.

A detecção das citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e $\text{IFN}\gamma$ foi realizada por meio de ELISA tipo sanduíche, a partir do sobrenadante da cultura de células do baço. A técnica consiste na utilização de anticorpos monoclonais para captura de IL-4, IL-10, $\text{IFN}\gamma$ e IL-13.

Para a dosagem de IL-4 e IL-10 foram utilizados os kits *Mouse IL-4 ELISA* (Lote: 26389) e *Mouse IL-10 ELISA* (Lote: 20169) *Set BD OptEIA™* (BD BIOSCIENCES, SAN DIEGO, CA). As microplacas para ELISA *High binding* (CORNING, NY, EUA) foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal para IL-4 (1microlitro por mililitro ($\mu\text{L}/\text{mL}$) em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6) ou IL-10 ($1\mu\text{L}/\text{mL}$ em PBS) no volume de 80 μL por poço da placa, e foram mantidas a 4 °C por 24 horas (h). Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 e incubadas com solução de bloqueio (SBF a 5% em PBS) com 120 $\mu\text{L}/\text{poço}$, por 50 minutos (min), em temperatura ambiente (TA). As placas foram lavadas novamente em PBS-Tween 20 a 5% e foram adicionados 80 μL do sobrenadante de cultura equivalente a cada animal. Para a curva padrão, foram adicionadas as citocinas murinas recombinantes IL-4 ou IL-10 (BD BIOSCIENCES, SAN DIEGO, CA), em diluições sucessivas a 1:2 em meio RPMI completo, na concentração inicial de 5ng/mL. As placas foram mantidas a 4°C por 24 h, sendo em seguida, lavadas novamente com PBS-Tween 20. Os anticorpos monoclonais acoplados a biotina para IL-4 ou IL-10 foram diluídos a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução de bloqueio com 1 μL de streptoavidina-peroxidase e adicionados às placas (80 μL por poço). Após uma hora em TA, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e foram adicionados 50 μL da solução de substrato, composta de

Tetrametilbenzidina (TMB, INVITROGEN) e peróxido de hidrogênio. As placas foram mantidas ao abrigo da luz durante 15 a 30 min a TA; a reação colorimétrica foi interrompida com 20µL de solução de ácido sulfúrico a 2 normal (N). A densidade óptica (DO) foi detectada por leitor de microplacas *Thermo Labsystems*, com filtro de 450 nanômetros (nm) (OLIVEIRA et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2005).

Para a dosagem de IFN γ e IL-13 as microplacas para ELISA *High binding* foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal para IFN γ (clone XMG 1.2 a 5µg/mL em PBS) ou IL-13 (clone 38213.11 Lot: AEQ032081 R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, EUA, a 5µg/mL em PBS) no volume de 80µL por poço da placa, e foram mantidas a 4 °C, por 24 h. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20 e incubadas com solução de bloqueio com 160µL/poço, por 45min, a 35 °C. As placas foram lavadas novamente em PBS-Tween 20 e foram adicionados 80µL do sobrenadante de cultura equivalente a cada animal. Para a curva padrão, foi adicionada a citocina murina recombinante IFN γ ou IL-13 (R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, EUA), em diluições sucessivas a 1:2 em meio RPMI completo, na concentração inicial de 10ng/mL. As placas foram mantidas a 4°C por 24 h, sendo em seguida, lavadas novamente com PBS-Tween 20. Os anticorpos monoclonais acoplados a biotina para IFN γ (clone AN-18 a 5µg/mL de solução de bloqueio) ou IL-13 (Lot: AJP063091, R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, EUA a 5µg/mL de solução de bloqueio) foram adicionados às placas (80µL). Após 2h a 35°C, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 e foram adicionados 80µL de streptoavidina-peroxidase (SIGMA) diluída 1:1.000 em solução de bloqueio. Após 30min de incubação a 35°C, as placas foram lavadas 10 vezes com PBS-Tween 20 e então foram adicionados 80µL da solução de substrato, composta de O-fenilenodiamina diclorada (OPD, SIGMA) a 5mg/mL em tampão citrato-fosfato pH 5,0, acrescida de 5µL/mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes. As placas foram mantidas ao abrigo da luz durante 10 a 30 min em TA e a reação colorimétrica foi interrompida com 20µL de solução de ácido sulfúrico a 2N. A DO foi detectada por leitor de microplacas *Thermo Labsystems*, com filtro de 492 nm e filtro de referência de 620 nm (OLIVEIRA et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2005).

4.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa *Sigma Stat*; todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea.

Para os valores de intensidade das alterações macro e microscópicas foram estabelecidos os seguintes escores: ausente - escore 0 ; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste não paramétrico *Mann-Whitney*; as linhagens foram comparadas entre si a cada dia experimental.

Os dias experimentais foram comparados dentro da mesma linhagem quanto à área da vesícula, com o auxílio da Análise de Variância simples (*ANOVA*), seguida do teste *Holm-Sidak*, quando houve diferença estatística entre os grupos; e entre as linhagens dentro do mesmo dia experimental pelo Teste *t*.

Com relação à dosagem de citocinas a partir dos sobrenadantes de cultura, culturas sem e com estímulo de ConA foram comparados infectado *versus* (*vs*) controle e entre as linhagens nos dias experimentais. Para todos os testes, as diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os animais, durante os dias experimentais, ficaram adaptados em gaiolas com enriquecimento ambiental. Essa interferência de ambiente foi necessária para o bom desenvolvimento da pesquisa, uma vez que observou-se em outros animais sinais de estresse, como mordeduras, o que poderia interferir na possível resposta inflamatória a ser analisada. As técnicas de EA produzem um ambiente não estático, resgatando instintos e comportamentos próximos aos naturais (OLIVARES & SANTOS, 2012).

5.1 Análise morfológica e morfométrica

Para a avaliação dos processos patológicos gerais desenvolvidos na interface parasito-hospedeiro dos camundongos infectados com *T. crassiceps*, foram realizadas coletas da região subcutânea adjacente à infecção, aos 07, 30, 60 e 90 DAI. As análises morfológicas das lesões estão registradas tanto macroscópica - Tabela 1 e Figura 6 - quanto microscopicamente - Tabelas 2A, B, C e D, e Figuras 7, 8, 9, 10 e 11.

Macroscopicamente, observou-se nos animais infectados das duas linhagens, a formação de uma vesícula circunscrita aos cisticercos, de tamanho correspondente à multiplicação e desenvolvimento dos parasitos no seu interior. A presença dos cisticercos induziu no local infectado a instalação de um processo inflamatório inicialmente com sinais de hiperemia, exsudação plasmática e celular, que evoluiu para a cronicidade, sem cura observada aos dias experimentais, apresentando persistência da infecção e fenômenos reparativos como fibrose, dada pela opacidade da membrana.

Aos 07 DAI os animais de ambas as linhagens apresentaram uma vesícula pequena contendo poucos cisticercos no seu interior (Figura 6 A e B); a membrana da vesícula em 80% dos animais estava translúcida nas duas linhagens. Observou-se que nos animais IL-4-KO a hiperemia foi mais intensa do que nos animais convencionais. Os animais das duas linhagens não apresentaram os demais processos patológicos avaliados (hemorragia, fibrose e inflamação aguda exsudativa e purulenta) neste dia experimental. A área da vesícula foi de $0,508 \pm 0,244 \text{ cm}^2$ para os animais IL-4-KO, e $0,411 \pm 0,184 \text{ cm}^2$ para os animais WT, sem diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($p=0,548$).

Aos 30 DAI a vesícula das duas linhagens estavam aumentadas com relação ao dia experimental anterior (Figura 6 C e D), contendo uma maior quantidade de cisticercos. A hiperemia se manteve mais intensa nos animais IL-4-KO. Já a hemorragia foi discreta em todos esses animais, enquanto nos animais WT, houve variação de ausente a moderado. A fibrose estava presente e de intensidade discreta na linhagem IL-4-KO. A inflamação aguda exsudativa e purulenta estava presente de forma moderada em 80% dos animais IL-4-KO, sendo que nos animais WT apenas 40% apresentavam essa alteração. A membrana da vesícula encontrava-se opaca na maior parte dos animais de ambas as linhagens. Nesta fase os animais WT apresentaram vesículas de área igual a $2,449 \pm 1,025 \text{ cm}^2$, e os animais IL-4-KO, $1,874 \pm 0,434 \text{ cm}^2$; não havendo diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($p=0,281$).

Aos 60 DAI constatou-se que a hiperemia foi semelhante em relação aos dias experimentais anteriores. Entre os animais IL-4-KO, 40% apresentaram hemorragia moderada, enquanto 60% dos animais WT apresentaram em intensidade discreta. 80% dos animais IL-4-KO apresentaram fibrose em quantidade moderada, sendo que nos animais WT apenas 40%. Em ambas as linhagens, observamos presença de inflamação aguda exsudativa e purulenta, variando de discreta a acentuada em 80% dos animais. A membrana estava opaca em ambas as linhagens durante esta fase (Figura 6 E e F). As medidas das áreas da vesícula foram de $2,325 \pm 1,127 \text{ cm}^2$, e $3,372 \pm 1,884 \text{ cm}^2$, para as linhagens WT e IL-4-KO, respectivamente; não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($p=0,317$).

Aos 90 DAI a hiperemia manteve-se discreta e a hemorragia discreta a moderada em ambas as linhagens. Observou-se fibrose e inflamação aguda exsudativa e purulenta predominantemente acentuada nas duas linhagens. Nesta fase, a membrana estava opaca em 60% dos animais WT e 100% dos IL-4-KO (Figura 6 G e H). A área da vesícula nos animais WT foi de $4,598 \pm 2,657 \text{ cm}^2$, e nos IL-4-KO de $2,321 \pm 2,709 \text{ cm}^2$, sem diferença estatisticamente significativa entre as linhagens ($p=0,217$).

Apenas na linhagem WT houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p=0,005$), e a diferença estava entre os grupos 07 e 30 DAI, e 07 e 90 DAI. Não houve diferença entre as linhagens quando comparados os dias experimentais.

Tabela 1: Aspectos macroscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Alterações macroscópicas	DAI	BALB/c convencional (n=5)				BALB/c IL-4-KO (n=5)				p
		% (n)				% (n)				
		Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	
Hiperemia	07	-	80 (4)	20 (1)	-	-	60 (3)	40 (2)	-	> 0,05
	30	-	80 (4)	20 (1)	-	-	60 (3)	40 (2)	-	> 0,05
	60	-	80 (4)	20 (1)	-	-	60 (3)	40 (2)	-	> 0,05
	90	-	80 (4)	-	20 (1)	-	60 (3)	40 (2)	-	> 0,05
Hemorragia	07	100 (5)	-	-	-	100 (5)	-	-	-	> 0,05
	30	20 (1)	60 (3)	20 (1)	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
	60	40 (2)	60 (3)	-	-	40 (2)	20 (1)	40 (2)	-	> 0,05
	90	20 (1)	40 (2)	40 (2)	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	-	> 0,05
Fibrose	07	80 (4)	20 (1)	-	-	80 (4)	20 (1)	-	-	> 0,05
	30	40 (2)	60 (3)	-	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
	60	-	60 (3)	40 (2)	-	20 (1)	-	80 (4)	-	> 0,05
	90	-	-	40 (2)	60 (3)	-	-	-	100 (5)	> 0,05
Inflamação Aguda Exsudativa Purulenta	07	80 (4)	20 (1)	-	-	80 (4)	20 (1)	-	-	> 0,05
	30	-	60 (3)	40 (2)	-	-	20 (1)	80 (4)	-	> 0,05
	60	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	-	60 (3)	20 (1)	20 (1)	> 0,05
	90	-	-	40 (2)	60 (3)	-	20 (1)	-	80 (4)	> 0,05
Membrana		Translúcida		Opaca		Translúcida		Opaca		
	07	80 (4)		20 (1)		80 (4)		20 (1)		> 0,05
	30	20 (1)		80 (4)		-		100 (5)		> 0,05
	60	-		100 (5)		20 (1)		80 (4)		> 0,05
90	40 (2)		60 (3)		-		100 (5)		> 0,05	
Área (cm ²)	07	0,411 ± 0,184				0,508 ± 0,244				> 0,05
	30	2,449 ± 1,025				1,874 ± 0,434				> 0,05
	60	2,325 ± 1,127				3,372 ± 1,884				> 0,05
	90	4,598 ± 2,657				2,321 ± 2,709				> 0,05

Para a análise estatística, a intensidade das alterações foi considerada da seguinte forma: ausente - escore 0 ; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste *Mann-Whitney*. O teste *t* foi empregado para a comparação da área da vesícula entre os grupos. Os dados representam estudo com 5 animais/grupo (n=5).

*Resultado estatisticamente significante (p<0,05).

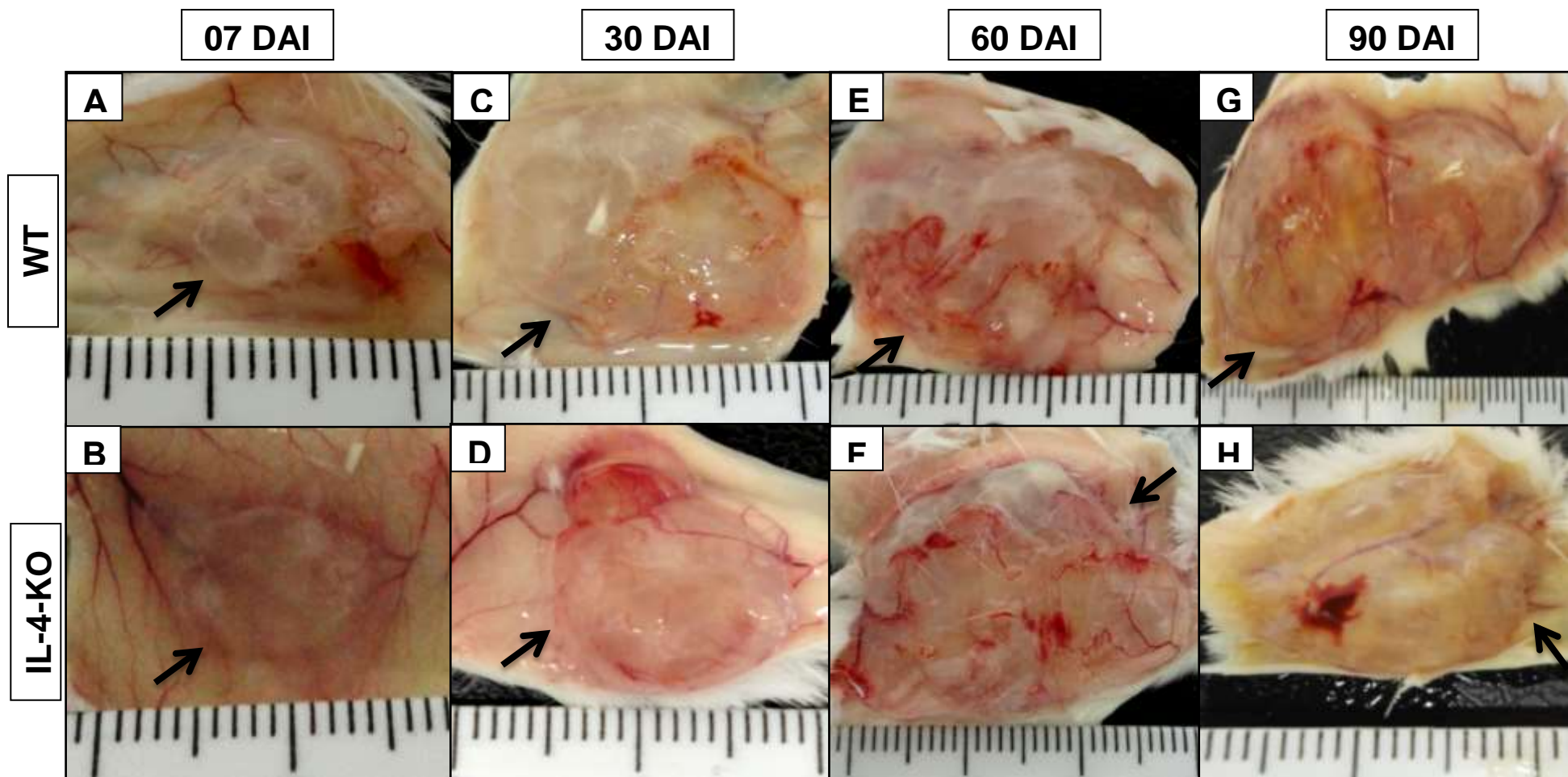


Figura 6 Macroscopia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO após a infecção com *Taenia crassiceps*. Aos 07 dias pós-inóculo. **A.** BALB/c WT. **B.** BALB/c IL-4-KO. Aos 30 dias pós-inóculo. **C.** BALB/c WT. **D.** BALB/c IL-4-KO. Aos 60 dias pós-inóculo. **E.** BALB/c WT. **F.** BALB/c IL-4-KO. Aos 90 dias pós-inóculo. **G.** BALB/c WT. **H.** BALB/c IL-4-KO. A seta indica a vesícula contendo cisticercos.

Microscopicamente, aos 07 DAI observou-se a presença de processos patológicos gerais na interface hospedeiro-parasito do tipo infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos nas duas linhagens WT e IL-4-KO, nesta última de intensidade acentuada em 60% dos casos (Tabela 2A, Figura 7). Houve presença discreta de macrófagos em ambas as linhagens. Linfócitos e plasmócitos estavam ausentes em mais de 80% dos animais KO-IL-4 e em 100% dos animais WT. Não foram encontrados eosinófilos nos animais IL-4-KO, já nos animais WT apresentara-se em intensidade discreta. Nesta fase encontrou-se também necrose caseosa no subcutâneo dos animais IL-4-KO, sendo que nos animais WT este tipo de morte celular só foi observada aos 30 DAI. O edema e a hiperemia foram moderados em ambas as linhagens. Fibrina e tecido de granulação foram observados em quantidades discretas nas duas linhagens. O granuloma foi predominantemente primário tanto nos animais WT quanto IL-4-KO. Foram encontrados cisticercos em estágios inicial e larval, porém nos animais WT os cisticercos estavam preservados, enquanto nos animais IL-4-KO havia cisticercos já em destruição.

Aos 30 DAI, observou-se a presença acentuada de macrófagos e discreta de linfócitos em ambas as linhagens (Tabela 2B, Figura 8). Os neutrófilos permaneceram aumentados nos animais IL-4-KO e os eosinófilos estavam ausentes, com diferença estatisticamente significativa em relação aos animais WT. Em ambas as linhagens, houve presença de necrose caseosa moderada e edema discreto. O tecido de granulação se apresentava acentuado na linhagem IL-4-KO, e moderado nos animais WT. Observou-se presença de fibrina moderada nos animais IL-4-KO e discreta em WT. Os cisticercos encontrados estavam em estágio larval ou final, grande parte, em destruição em ambas as linhagens. As características dos granulomas nesta fase foram consideradas para classificá-los predominantemente em terciários.

Aos 60 DAI os macrófagos se mantiveram em quantidade acentuada em ambas as linhagens (Tabela 2C, Figura 9). Não foram encontrados eosinófilos na interface parasito-hospedeiro nos animais IL-4-KO, e nos animais WT foram encontrados em intensidade discreta. Nesta fase, foram observados macrófagos espumosos em ambas as linhagens e cristais de colesterol apenas nos animais WT. Calcificação e pigmentação não foram encontradas. A hiperemia foi mais acentuada nos animais IL-4-KO do que nos animais WT. A fibrina não foi observada nesta fase da infecção. Observou-se presença de plasmócitos em intensidade discreta nos animais WT, com diferença estatisticamente significativa em relação aos IL-4-KO. Os

granulomas foram classificados como terciários em ambas as linhagens, com presença de cisticercos larvais e finais em destruição.

Aos 90 DAI, observou-se intensidade discreta de linfócitos e acentuada de macrófagos em ambas as linhagens (Tabela 2D, Figura 10). 80% dos animais WT apresentavam plasmócitos em intensidade discreta, a mesma encontrada em apenas 20% dos animais IL-4-KO. Os neutrófilos variaram de discreto a moderado nos animais WT, e estavam predominantemente acentuados nos animais IL-4-KO. Os eosinófilos estavam presentes em intensidade discreta em 80% dos animais WT, e ausentes nos animais IL-4-KO, com diferença estatisticamente significativa. Calcificação e pigmentação foram encontradas apenas nos animais WT. Observou-se hemorragia discreta a moderada nos animais WT e discreta nos IL-4-KO, com diferença estatisticamente significativa. Foi observado hiperemia e tecido de granulação em intensidade moderada a acentuada em ambas as linhagens. Macrófagos espumosos estavam presentes nas duas linhagens e cristais de colesterol apenas nos animais WT. Na linhagem WT foram encontrados cisticercos em estágio larval em destruição e final, e na IL-4-KO, em estágio larval em destruição. Os granulomas foram classificados como terciários nas duas linhagens.

Tabela 2A: Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 07 dias de infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Alterações microscópicas	BALB/c convencional (n=5)					BALB/c IL-4-KO (n=5)					p
	Ausente	Presente	% (n)			Ausente	Presente	% (n)			
			Discreto	Moderado	Acentuado			Discreto	Moderado	Acentuado	
Linfócitos	100 (5)	-	-	-	-	80 (4)	-	20 (1)	-	-	> 0,05
Plasmócitos	100 (5)	-	-	-	-	80 (4)	-	20 (1)	-	-	> 0,05
Macrófagos	-	-	80 (4)	20 (1)	-	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
Neutrófilos	-	-	-	100 (5)	-	-	-	20 (1)	20 (1)	60 (3)	> 0,05
Eosinófilos	-	-	100 (5)	-	-	40 (2)	-	60 (3)	-	-	> 0,05
Fibroblastos	-	-	40 (2)	60 (3)	-	-	-	60 (3)	40 (2)	-	> 0,05
Macrófagos espumosos	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Cristais de colesterol	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Calcificação	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Pigmentação	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Necrose caseosa	80 (4)	-	20 (1)	-	-	20 (1)	-	80 (4)	-	-	> 0,05
Edema	-	-	20 (1)	80 (4)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	-	> 0,05
Hemorragia	80 (4)	-	-	20 (1)	-	80 (4)	-	-	20 (1)	-	> 0,05
Hiperemia	-	-	40 (2)	60 (3)	-	-	-	20 (1)	40 (2)	40 (2)	> 0,05
Tecido de granulação	-	-	100 (5)	-	-	20 (1)	-	60 (3)	20 (1)	-	> 0,05
Fibrina	20 (1)	-	60 (3)	20 (1)	-	20 (1)	-	40 (2)	40 (2)	-	> 0,05
Granuloma (classificação)	Primário		Secundário		Terciário	Primário		Secundário		Terciário	
	100 (5)		-		-	80 (4)		20 (1)		-	
	Inicial		Larval		Final	Inicial		Larval		Final	
Cisticerco (fase)	60 (3)*		60 (3)*		-	60 (3)*		40 (2)*		20 (1)*	
	Preservado		Em destruição			Preservado		Em destruição			
Cisticerco (estado)	80 (4)		20 (1)			40 (2)		60 (3)			

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: ausente - escore 0; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste *Mann-Whitney*. Os dados representam estudo com 5 animais/grupo (n=5).

*As variáveis não somam 100% pois o mesmo animal apresentou cisticercos em várias fases de desenvolvimento. **Resultado estatisticamente significativo (p<0,05).

Tabela 2B: Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 30 dias de infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Alterações microscópicas	BALB/c convencional (n=5)					BALB/c IL-4-KO (n=5)					P
	Ausente	Presente	% (n)			Ausente	Presente	% (n)			
Linfócitos	-	-	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
Plasmócitos	100 (5)	-	-	-	-	40 (2)	-	60 (3)	-	-	> 0,05
Macrófagos	-	-	20 (1)	20 (1)	60 (3)	-	-	-	20 (1)	80 (4)	> 0,05
Neutrófilos	-	-	60 (3)	20 (1)	20 (1)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	> 0,05
Eosinófilos	-	-	80 (4)	20 (1)	-	100 (5)	-	-	-	-	< 0,05 **
Fibroblastos	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	80 (4)	20 (1)	> 0,05
Macrófagos espumosos	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Cristais de colesterol	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Calcificação	80 (4)	-	20 (1)	-	-	60 (3)	-	40 (2)	-	-	> 0,05
Pigmentação	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Necrose caseosa	-	-	20 (1)	60 (3)	20 (1)	-	-	20 (1)	60 (3)	20 (1)	> 0,05
Edema	-	-	100 (5)	-	-	-	-	80 (4)	20 (1)	-	> 0,05
Hemorragia	60 (3)	-	40 (2)	-	-	40 (2)	-	40 (2)	-	20 (1)	> 0,05
Hiperemia	-	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	-	-	-	80 (4)	20 (1)	> 0,05
Tecido de granulação	-	-	20 (1)	60 (3)	20 (1)	-	-	-	20 (1)	80 (4)	> 0,05
Fibrina	100 (5)	-	-	-	-	-	-	40 (2)	20 (1)	40 (2)	> 0,05
Granuloma (classificação)	Primário		Secundário		Terciário	Primário		Secundário		Terciário	
	-		40 (2)		60 (3)	-		20 (1)		80 (4)	
	Inicial		Larval		Final	Inicial		Larval		Final	
Cisticercos (fase)	20 (1)*		100 (5)*		-	-		100 (5)*		60 (3)*	
	Preservado		Em destruição		Preservado		Em destruição		Preservado		Em destruição
Cisticercos (estado)	60 (3)		80 (4)		20 (1)		100 (5)		20 (1)		100 (5)

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: ausente - escore 0; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste *Mann-Whitney*. Os dados representam estudo com 5 animais/grupo (n=5).

*As variáveis não somam 100% pois o mesmo animal apresentou cisticercos em várias fases de desenvolvimento. **Resultado estatisticamente significativo (p<0,05).

Tabela 2C: Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 60 dias de infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Alterações microscópicas	BALB/c convencional (n=5)					BALB/c IL-4-KO (n=5)					P
	% (n)					% (n)					
	Ausente	Presente	Discreto	Moderado	Acentuado	Ausente	Presente	Discreto	Moderado	Acentuado	
Linfócitos	40 (2)	-	60 (3)	-	-	80 (4)	-	20 (1)	-	-	> 0,05
Plasmócitos	-	-	100 (5)	-	-	80 (4)	-	20 (1)	-	-	< 0,05**
Macrófagos	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	> 0,05
Neutrófilos	-	-	-	100 (5)	-	-	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	> 0,05
Eosinófilos	-	-	100 (5)	-	-	60 (3)	-	20 (1)	-	20 (1)	> 0,05
Fibroblastos	-	-	-	60 (3)	40 (2)	-	-	-	80 (4)	20 (1)	> 0,05
Macrófagos espumosos	40 (2)	60 (3)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	-	-	-	
Cristais de colesterol	40 (2)	60 (3)	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Calcificação	80 (4)	20 (1)	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Pigmentação	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Necrose caseosa	-	-	20 (1)	60 (3)	20 (1)	20 (1)	-	20 (1)	40 (2)	20 (1)	> 0,05
Edema	-	-	80 (4)	20 (1)	-	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
Hemorragia	20 (1)	-	80 (4)	-	-	60 (3)	-	40 (2)	-	-	> 0,05
Hiperemia	-	-	20 (1)	40 (2)	40 (2)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	> 0,05
Tecido de granulação	-	-	20 (1)	20 (1)	60 (3)	-	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	> 0,05
Fibrina	60 (3)	-	20 (1)	20 (1)	-	80 (2)	-	20 (1)	-	-	> 0,05
Granuloma (classificação)	Primário	Secundário	Terciário			Primário	Secundário	Terciário			
	-	-	100 (5)			-	20 (1)	80 (4)			
	Inicial	Larval	Final			Inicial	Larval	Final			
Cisticerco (fase)	20 (1)*	100 (5)*	20 (5)*			20 (1)*	60 (3)*	100 (5)*			
	Preservado	Em destruição			Preservado	Em destruição					
Cisticerco (estado)	40 (2)	60 (3)			40 (2)	100 (5)					

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: ausente - escore 0; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste *Mann-Whitney*. Os dados representam estudo com 5 animais/grupo (n=5).

*As variáveis não somam 100% pois o mesmo animal apresentou cisticercos em várias fases de desenvolvimento. **Resultado estatisticamente significativo (p<0,05).

Tabela 2D: Aspectos microscópicos dos processos patológicos gerais na interface parasito-hospedeiro no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após 90 dias de infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Alterações microscópicas	BALB/c convencional (n=5)					BALB/c IL-4-KO (n=5)					p
	Ausente	Presente	% (n)			Ausente	Presente	% (n)			
			Discreto	Moderado	Acentuado			Discreto	Moderado	Acentuado	
Linfócitos	-	-	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
Plasmócitos	20 (1)	-	80 (4)	-	-	60 (3)	-	40 (2)	-	-	> 0,05
Macrófagos	-	-	-	40 (2)	60 (3)	-	-	-	20 (1)	80 (4)	> 0,05
Neutrófilos	-	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	-	-	20 (1)	-	80 (4)	> 0,05
Eosinófilos	-	-	80 (4)	20 (1)	-	80 (4)	-	20 (1)	-	-	< 0,05**
Fibroblastos	-	-	-	60 (3)	40 (2)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	> 0,05
Macrófagos espumosos	-	100 (5)	-	-	-	20 (1)	80 (4)	-	-	-	
Cristais de colesterol	60 (3)	40 (2)	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	
Calcificação	60 (3)	-	20 (1)	-	20 (1)	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Pigmentação	60 (3)	-	40 (2)	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Necrose caseosa	20 (1)	-	-	60 (3)	20 (1)	-	-	100 (5)	-	-	> 0,05
Edema	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05
Hemorragia	-	-	40 (2)	40 (2)	20 (1)	60 (3)	-	40 (2)	-	-	< 0,05**
Hiperemia	-	-	-	60 (3)	40 (2)	-	-	-	40 (2)	60 (3)	> 0,05
Tecido de granulação	-	-	-	80 (4)	20 (1)	-	-	20 (1)	40 (2)	40 (2)	> 0,05
Fibrina	100 (5)	-	-	-	-	100 (5)	-	-	-	-	> 0,05

Granuloma (classificação)	Primário	Secundário	Terciário	Primário	Secundário	Terciário
	-	-	100 (5)	-	-	100 (5)
Cisticercos (fase)	Inicial	Larval	Final	Inicial	Larval	Final
	-	100 (5)*	40 (2)*	-	100 (5)*	-
Cisticercos (estado)	Preservado	Em destruição		Preservado	Em destruição	
	60 (3)	40 (2)		20 (1)	80 (4)	

Para a análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: ausente - escore 0; discreto - escore 1; moderado - escore 2; acentuado - escore 3; e submetidas ao teste *Mann-Whitney*. Os dados representam estudo com 5 animais/grupo (n=5).

*As variáveis não somam 100% pois o mesmo animal apresentou cisticercos em várias fases de desenvolvimento. **Resultado estatisticamente significante (p<0,05).

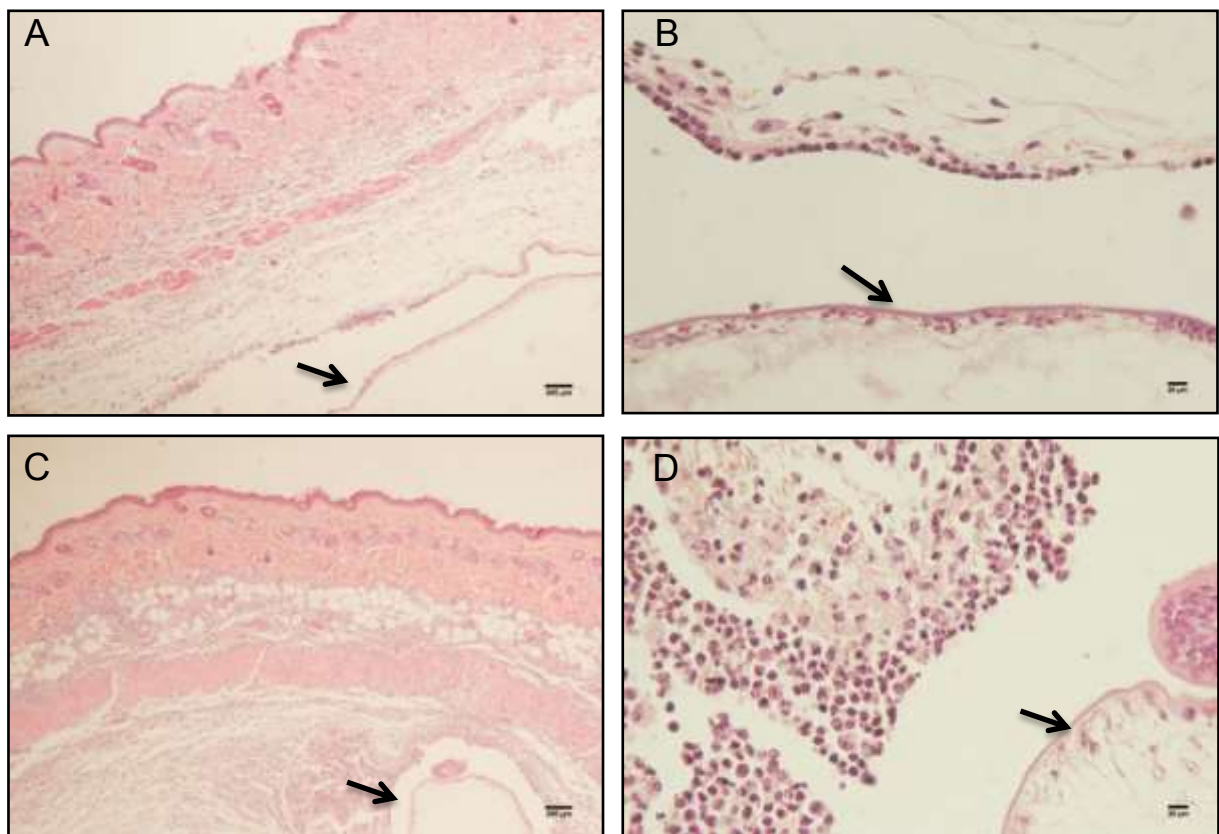


Figura 7 Fotomicrografia do tecido subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 07 dias após a infecção: **A.** BALB/c WT com infiltrado inflamatório moderado e difuso em todas as camadas da pele e próximo ao cisticerco em estágio inicial (seta) (HE, escala=200 μ m); **B.** Detalhe da figura A, apresentando a interface parasito-hospedeiro, com infiltrado inflamatório próximo ao tegumento do parasito (HE, escala=20 μ m); **C.** BALB/c IL-4-KO contendo cisticerco em estágio inicial (seta), com infiltrado inflamatório acentuado e difuso em todas as camadas da pele e próximo ao parasito (HE, escala=200 μ m); **D.** Detalhe da figura C, mostrando a interface parasito-hospedeiro, com infiltrado inflamatório próximo ao tegumento do parasito (HE, escala=20 μ m).

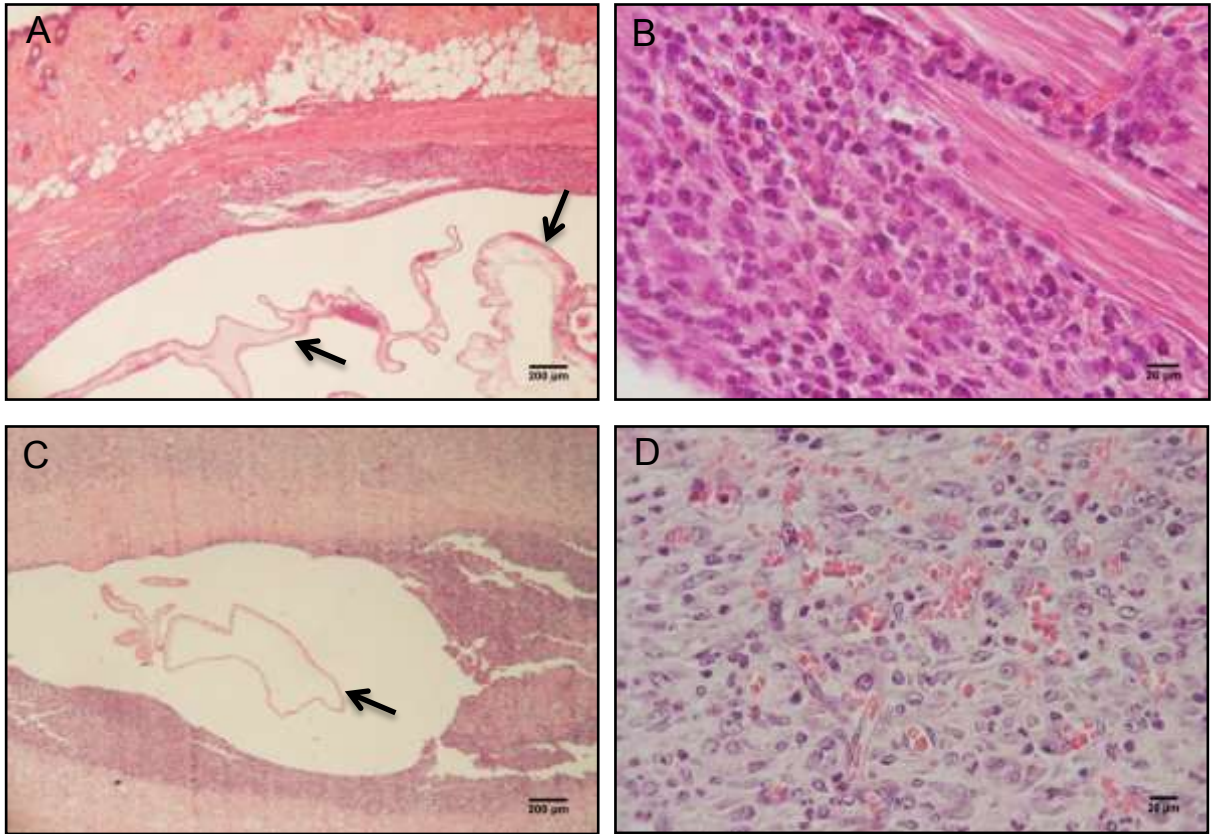


Figura 8 Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 30 dias após a infecção: **A.** BALB/c WT com infiltrado inflamatório acentuado próximo aos cisticercos em estágio larval (setas) (HE, escala=200 μ m); **B.** Detalhe da figura A, com infiltrado inflamatório acentuado (HE, escala=20 μ m); **C.** BALB/c IL-4-KO contendo cisticercos em estágio larval (seta), envolvido por infiltrado inflamatório acentuado (HE, escala=200 μ m); **D.** Detalhe da figura C, apresentando tecido de granulação acentuado (HE, escala=20 μ m).

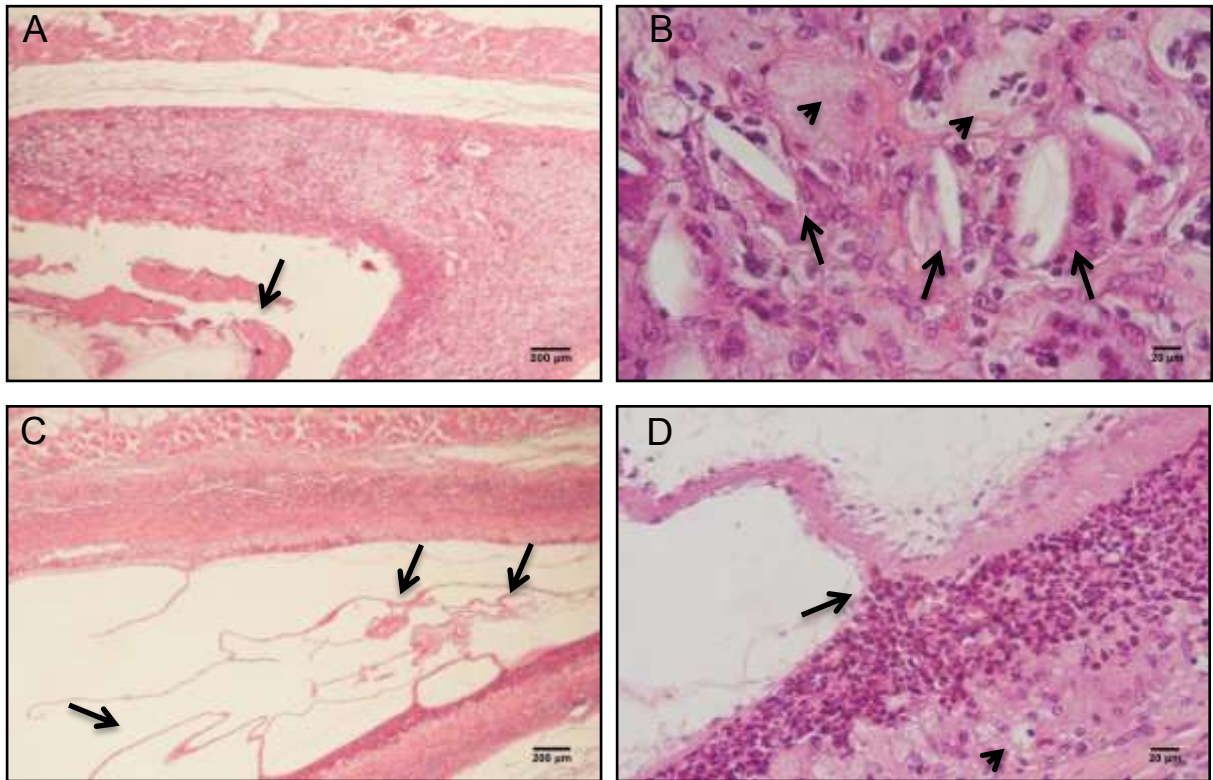


Figura 9 Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 60 dias após a infecção: **A.** BALB/c WT contendo cisticerco em estágio larval com região de necrose caseosa (seta) (HE, escala=200 μ m); **B.** Detalhe da figura A, apresentando cristais de colesterol (setas), e macrófagos espumosos (pontas de seta) (HE, escala=20 μ m); **C.** BALB/c IL-4-KO contendo infiltrado inflamatório acentuado próximo aos cisticercos (setas) (HE, escala=200 μ m); **D.** Detalhe da figura C, apresentando a interface parasito-hospedeiro, com infiltrado inflamatório próximo ao tegumento do parasito (seta), e presença de macrófagos espumosos (ponta de seta) (HE, escala=20 μ m).

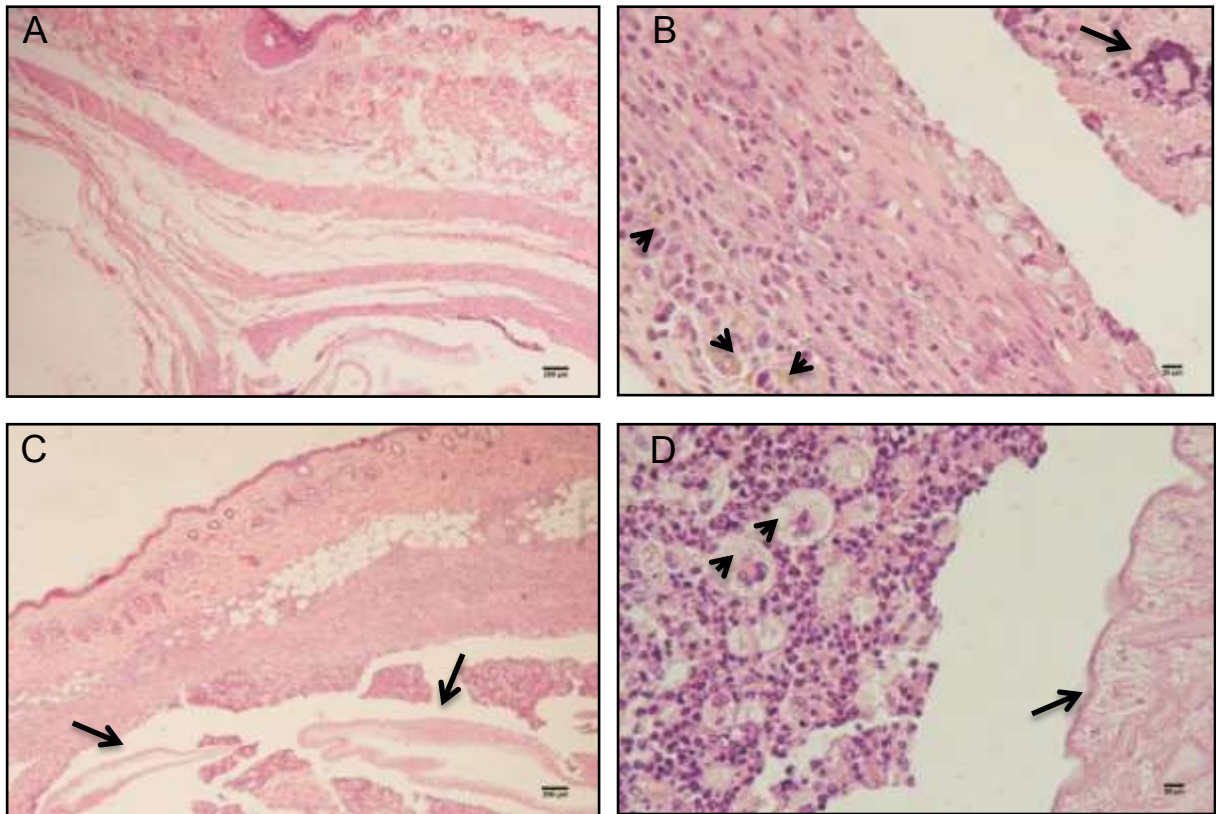


Figura 10 Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO aos 90 dias após a infecção: **A.** BALB/c WT contendo infiltrado inflamatório em todas as camadas da pele (HE, escala=200 μ m); **B.** Detalhe da figura A, apresentando em detalhe região de necrose caseosa com calcificação (seta), e macrófagos com hemossiderina (pontas de seta) (HE, escala=20 μ m); **C.** BALB/c IL-4-KO contendo infiltrado inflamatório acentuado próximo aos cisticercos em estágio larval (setas) (HE, escala=200 μ m); **D.** Detalhe da figura C, apresentando a interface parasito-hospedeiro, com infiltrado inflamatório próximo ao cisticercos (seta), e presença de macrófagos espumosos (ponta de seta) (HE, escala=20 μ m).

Em cortes de tecido infectado corados por micro-sírius vistos sob luz-polarizada, observou-se aos 07 dias de infecção presença de fibras curtas, desorganizadas, de coloração esverdeada, caracterizando colágeno do tipo III nas duas linhagens. Nos demais dias experimentais, 30, 60 e 90 DAI, as duas linhagens apresentaram fibras colágenas longas, organizadas, de coloração avermelhada, caracterizando colágeno do tipo I (Figura 11). Foi realizada a quantificação do colágeno e os resultados encontrados estão registrados na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3: Quantificação de colágeno em porcentagem no subcutâneo dos animais das linhagens BALB/c convencional e BALB/c deficientes para o gene de IL-4 após a infecção com cisticercos de *Taenia crassiceps*

Grupo experimental	BALB/c WT (n=5)	BALB/c IL-4-KO (n=5)	p
G07D	3,45 ± 1,98	2,25 ± 1,44	> 0,05
G30D	4,92 ± 3,38	3,90 ± 2,05	> 0,05
G60D	5,39 ± 2,47	5,96 ± 3,72	> 0,05
G90D	3,99 ± 3,56	7,71 ± 2,44	> 0,05

O teste t foi empregado para a comparação entre os grupos. Resultado estatisticamente significativo (p<0,05).

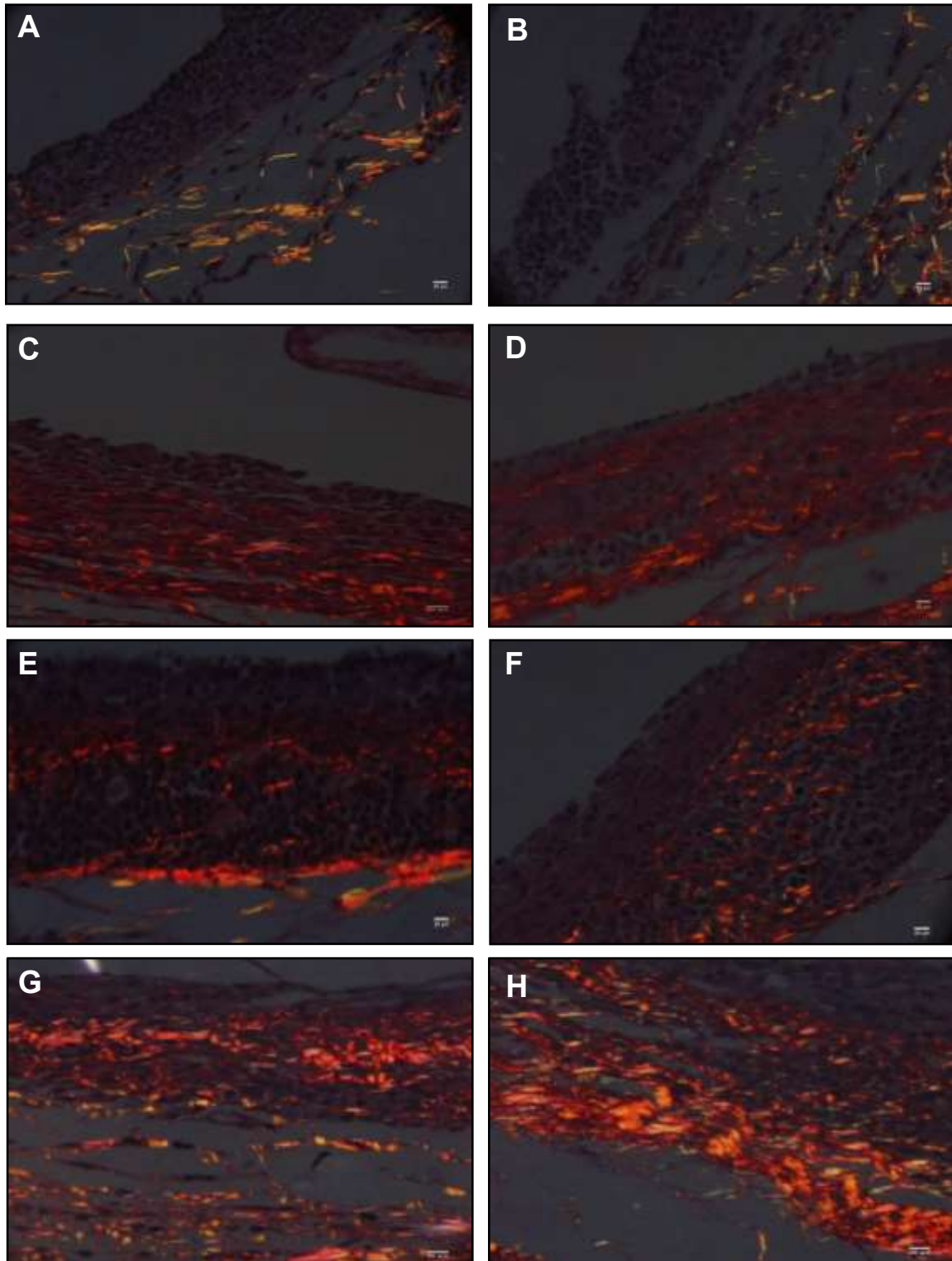


Figura 11 Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO corado por picro-sírius, visto sob luz polarizada (barra = 20 μ m). Aos 07 dias após a infecção: **A.** BALB/c WT; **B.** BALB/c IL-4-KO. Aos 30 dias após a infecção: **C.** BALB/c WT; **D.** BALB/c IL-4-KO. Aos 60 dias após a infecção: **E.** BALB/c WT; **F.** BALB/c IL-4-KO. Aos 90 dias após a infecção: **G.** BALB/c WT; **H.** BALB/c IL-4-KO.

5.2 Concentração das citocinas IL-4, IFN γ , IL-10 e IL-13 a partir do sobrenadante de cultura de esplenócitos

Foram realizadas culturas de esplenócitos dos animais infectados e controles das duas linhagens WT e IL-4-KO com posterior dosagem de citocinas, IFN γ , IL-4 e IL-10 a partir do sobrenadante das culturas. Os resultados de concentração das citocinas em ng/mL estão apresentados nas figuras 12 a 15.

Na dosagem da concentração de IL-4 dos animais WT com produção espontânea, ou seja sem estímulo com ConA, nenhum animal apresentou valor detectável, portanto não houve diferença significativa entre os grupos.

Com relação à concentração de IL-4 dos animais WT com estimulação quando comparados entre os dias experimentais, houve diferença estatisticamente significativa Controle *vs* Infectado aos 30 e 60 DAI, demonstrando que infectados produzem mais IL-4 quando estimulados com ConA se comparados aos controles.

Nos animais IL-4-KO, a ausência da citocina IL-4 foi confirmada por dosagem em sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais controle e infectados, em diferentes dias experimentais, sem e com estimulação com ConA (dados não mostrados).

Com relação aos níveis de IFN γ , a cultura de esplenócitos dos animais WT sem estimulação com ConA apresentaram diferença significativa Controle *vs* Infectado aos 07, 30 e 60 DAI. Animais IL-4-KO sem estimulação com ConA apresentaram diferença aos 90 DAI quando comparados Controle *vs* Infectado. Entre as linhagens, nas culturas de esplenócitos sem estímulo com ConA houve diferença significativa entre controles aos 07 DAI, e infectados aos 07, 30 e 60 DAI.

A análise da concentração de IFN γ nos animais WT com estimulação com ConA resultou em diferença estatisticamente significativa Controle *vs* Infectado aos 07, 30 e 90 DAI. Animais IL-4-KO com estímulo com ConA apresentaram diferença significativa Controle *vs* Infectado aos 07 DAI. Comparadas culturas de esplenócitos com ConA entre linhagens houve diferença significativa nos controles aos 07, 30 e 60 DAI, e em todos os grupos infectados. Observou-se que animais IL-4-KO controles respondem ao estímulo com ConA semelhante aos infectados (30, 60 e 90 DAI), diferente dos animais WT controles que produzem mais IFN γ que os infectados quando estimulados com ConA.

Com relação à concentração de IL-10, os animais WT sem estimulação com ConA apresentaram diferença estatisticamente significativa Controle *vs* Infectado aos

60 DAI. Animais IL-4-KO em produção espontânea apresentaram diferença significativa aos 30 e 90 DAI. Entre as linhagens as culturas sem estímulo com ConA houve diferença nos controles e nos infectados aos 30 e 90 DAI.

Para IL-10, as culturas de esplenócitos de animais WT com estímulo de ConA apresentaram diferença significativa Controle *vs* Infectado em todos os dias experimentais; infectados produziram mais IL-10 que controles quando estimulados com ConA (07, 30 e 90 DAI). Animais IL-4-KO com estímulo de ConA apresentaram diferença significativa aos 07 DAI Infectado *vs* Controle, e produziram mais IL-10 com relação aos WT infectados no mesmo dia. Quando comparadas as culturas com estímulo com ConA entre linhagens, houve diferença nos controles aos 60 DAI, e nos infectados aos 07 e 90 DAI.

Para a dosagem de IL-13, as culturas de esplenócitos de animais WT em produção espontânea apresentaram diferença estatisticamente significante Controle *vs* Infectado aos 90 DAI. Entre as linhagens sem estímulo com ConA houve diferença significativa nos controles aos 07 e 30 DAI, e nos infectados aos 30 DAI.

A concentração de IL-13 nas culturas de esplenócitos de animais WT e IL-4-KO com estímulo com ConA apresentou diferença estatisticamente significante Controle *vs* Infectado aos 07 DAI em ambas as linhagens. Quando comparadas entre si, as linhagens apresentaram diferença significante nos grupos controles com 07 DAI.

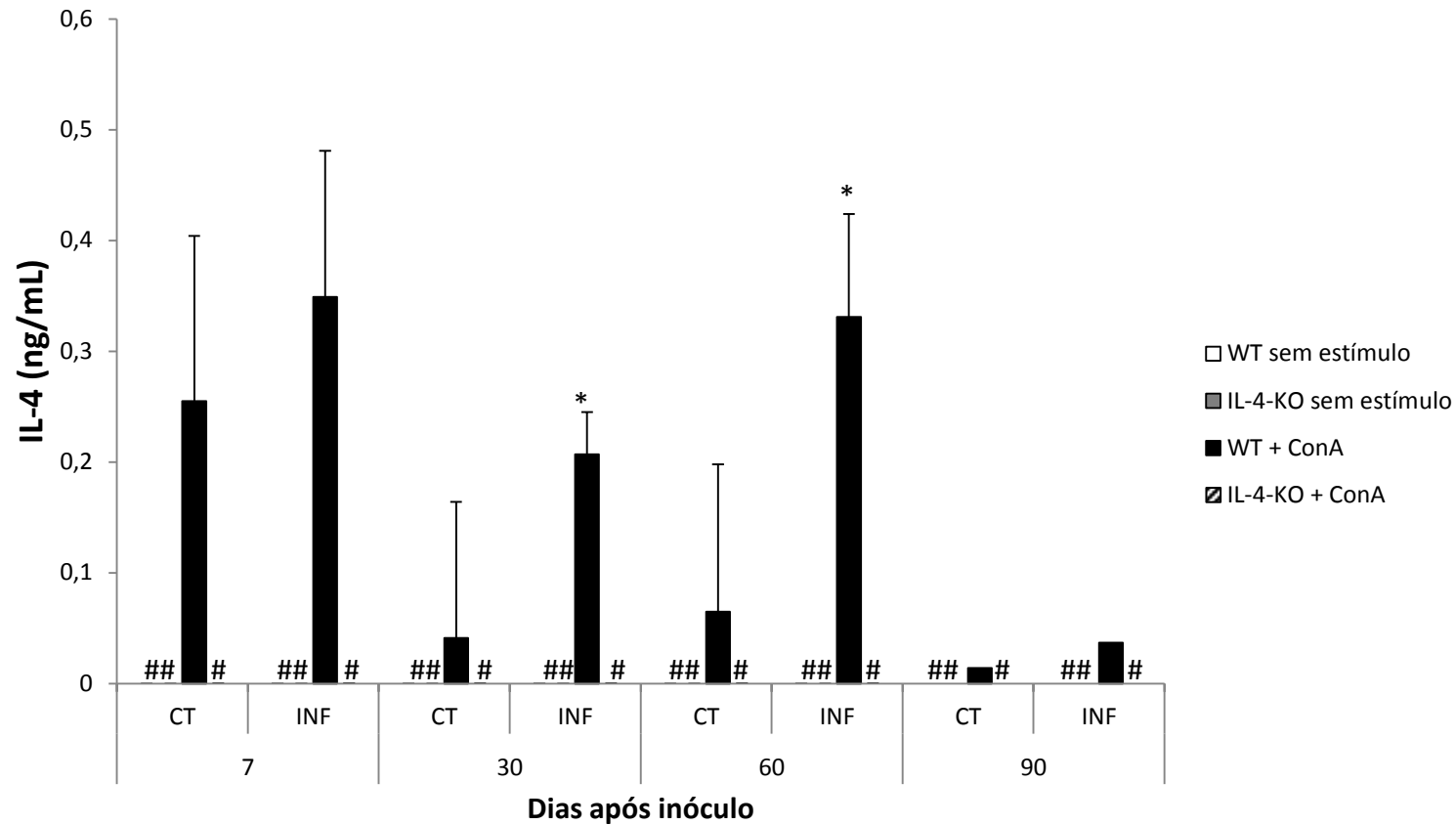


Figura 12 Produção de IL-4 em esplenócitos de camundongos BALB/c *Wild-type* (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps*. Os camundongos foram eutanasiados e os esplenócitos foram obtidos de cada animal de forma independente. Os níveis de IL-4 foram mensurados por ELISA sanduíche a partir do sobrenadante de cultura após 48h sem e com estimulação com Concanavalina A. Os dados representam média + desvio padrão de um experimento com 5 animais/grupo. CT: Grupo Controle. INF: Grupo Infectado. #Valor não detectado. Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$): (*) Controle *versus* Infectado.

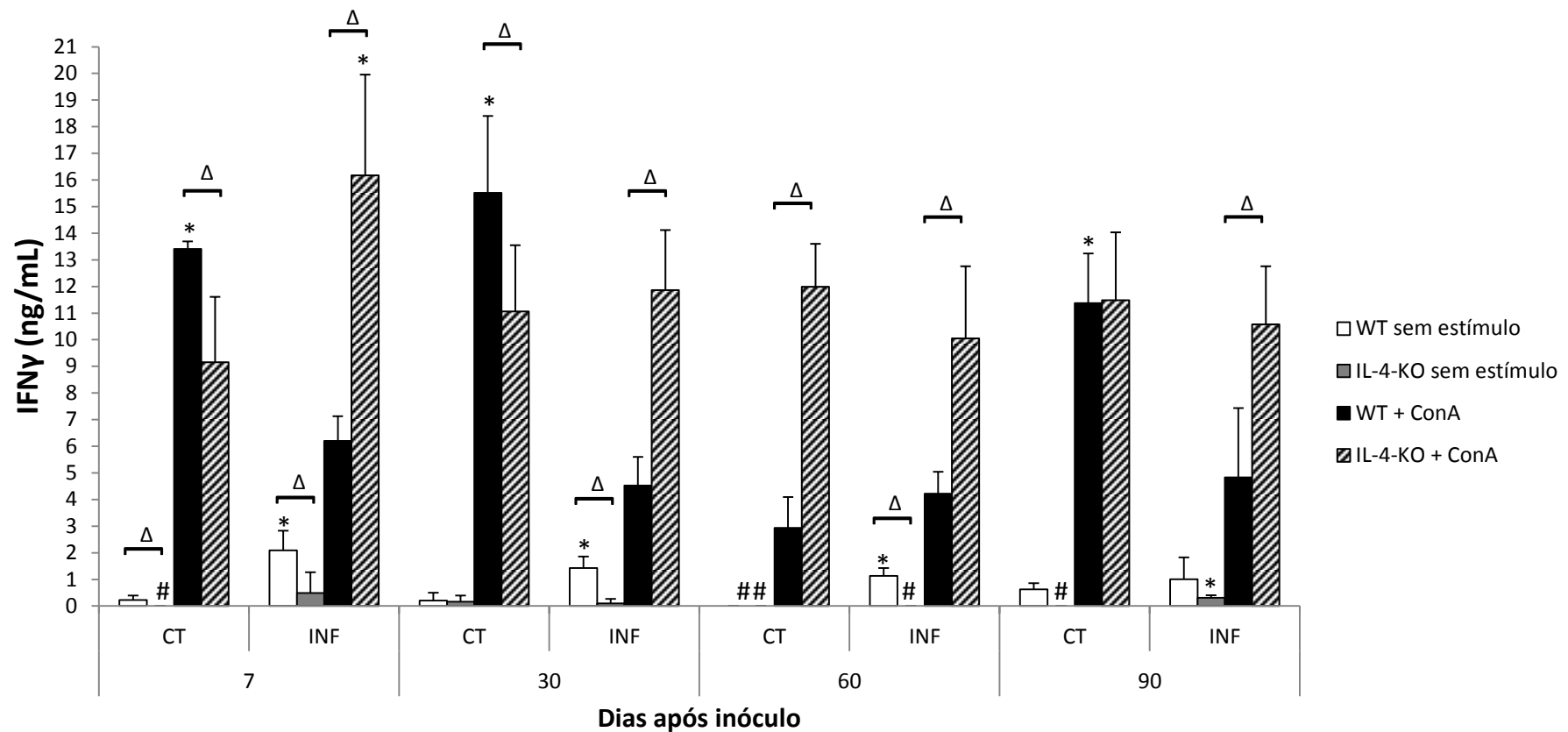


Figura 13 Produção de IFN γ em esplenócitos de camundongos BALB/c *Wild-type* (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps*. Os camundongos foram eutanasiados e os esplenócitos foram obtidos de cada animal de forma independente. Os níveis de IFN γ foram mensurados por ELISA sanduíche a partir do sobrenadante de cultura após 48h sem e com estimulação com Concanavalina A (ConA). Os dados representam média + desvio padrão de um experimento com 5 animais/grupo. CT: Grupo Controle. INF: Grupo Infectado. #Valor não detectado. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): (*) Controle versus Infectado, [Δ] WT versus IL-4-KO.

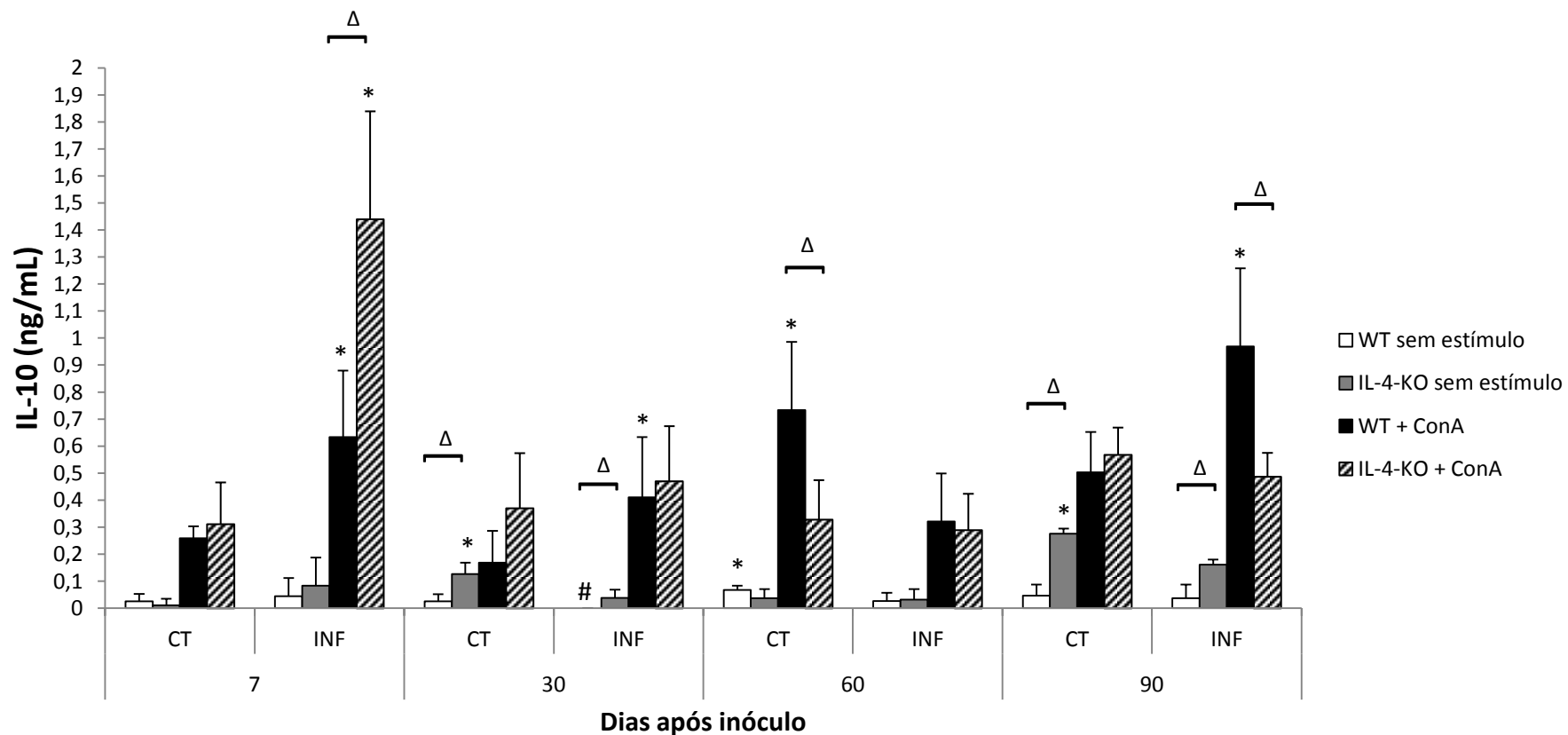


Figura 14 Produção de IL-10 em esplenócitos de camundongos BALB/c *Wild-type* (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps*. Os camundongos foram eutanasiados e os esplenócitos foram obtidos de cada animal de forma independente. Os níveis de IL-10 foram mensurados por ELISA sanduíche a partir do sobrenadante de cultura após 48h sem e com estimulação com Concanavalina A (ConA). Os dados representam média + desvio padrão de um experimento com 5 animais/grupo. CT: Grupo Controle. INF: Grupo Infectado. #Valor não detectado. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): (*) Controle *versus* Infectado, [Δ] WT *versus* IL-4-KO.

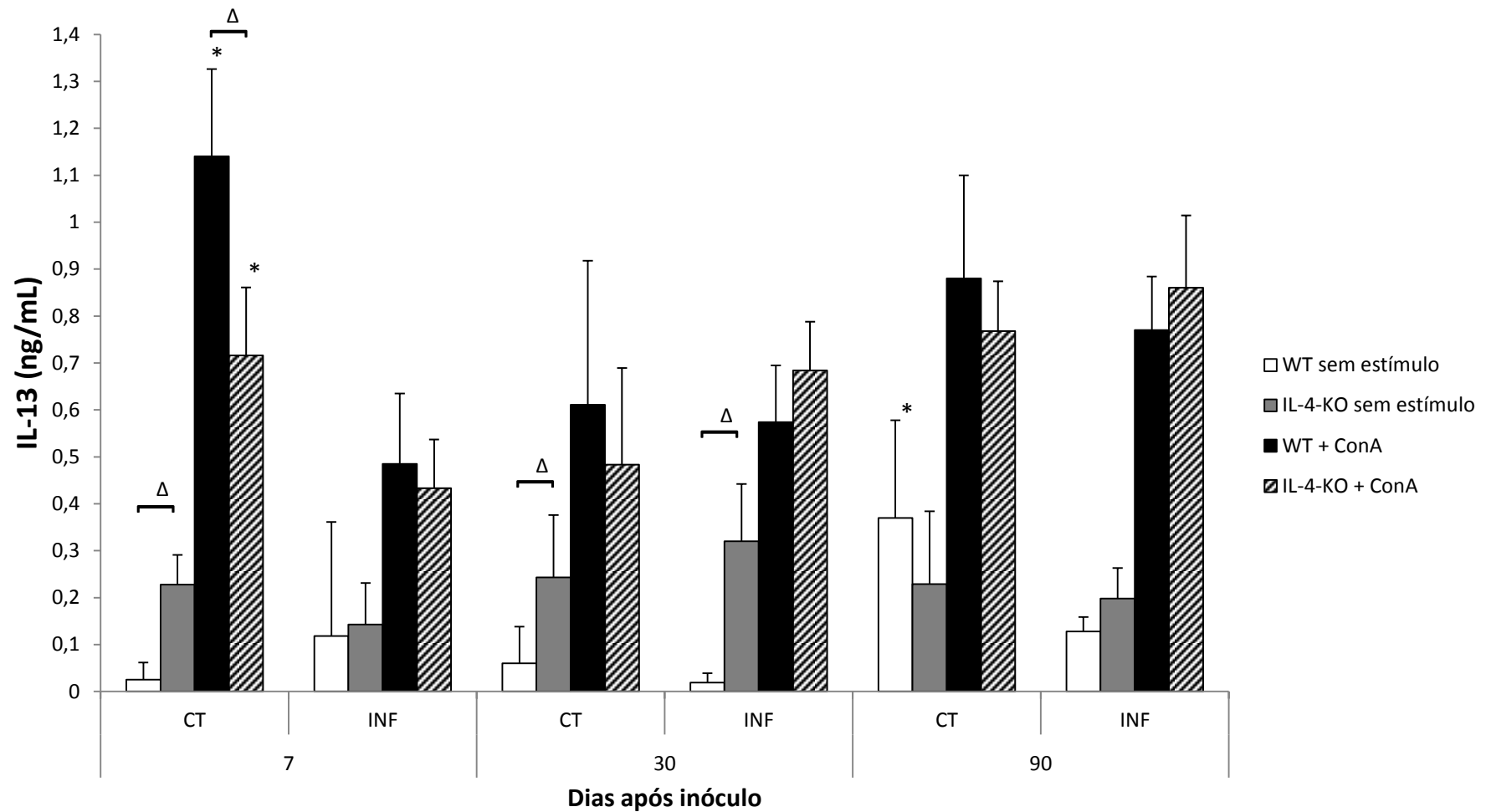


Figura 15 Produção de IL-13 em esplenócitos de camundongos BALB/c *Wild-type* (WT) e BALB/c deficientes para Interleucina-4 (IL-4-KO) com cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps*. Os camundongos foram eutanasiados e os esplenócitos foram obtidos de cada animal de forma independente. Os níveis de IL-13 foram mensurados por ELISA sanduíche a partir do sobrenadante de cultura após 48h sem e com estimulação com Concanavalina A (ConA). Os dados representam média + desvio padrão de um experimento com 5 animais/grupo. CT: Grupo Controle. INF: Grupo Infectado. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): (*) Controle *versus* Infectado, [Δ] WT *versus* IL-4-KO.

6 DISCUSSÃO

Este estudo utilizou como modelo experimental de cisticercose subcutânea a infecção na região dorsal com cisticercos de *T. crassiceps* em duas linhagens de camundongos: BALB/c WT e BALB/c IL-4-KO. No decorrer da infecção, observou-se a formação de uma vesícula em torno dos cisticercos, de tamanho correspondente à multiplicação e ao desenvolvimento dos cisticercos no seu interior.

Com relação à área da vesícula, não houve diferença significativa entre as linhagens, porém, quando comparados os dias experimentais dentro da mesma linhagem, houve diferença estatisticamente significativa para a linhagem WT ($p=0,005$), entre 07 e 30 DAI, e 07 e 90 DAI. A resposta Th1, possivelmente aumentada nos animais IL-4-KO pela atenuação da resposta Th2, não foi suficiente para conter a multiplicação dos cisticercos nesses animais, mesmo encontrando cisticercos em destruição aos 07 dias de infecção. Resposta Th1 inicial com evolução para um fenótipo misto Th1/Th2 com formação de granuloma e aumento da carga parasitária já foi observada em infecções helmínticas, incluindo cisticercose intraperitoneal e subcutânea por *T. crassiceps* (RESTREPO et al. 2001; FREITAS et al. 2012; MOURA et al. 2013).

A presença dos cisticercos induziu no local infectado a instalação de um processo inflamatório do tipo granulomatoso, sem cura observada aos dias experimentais, semelhante ao descrito para a linhagem C57BL/6 (FREITAS et al. 2012). Camundongos BALB/c são considerados geneticamente susceptíveis à infecção, sendo utilizados para manutenção da cepa “*in vivo*” em laboratórios de pesquisa, acredita-se que este fato justifique a ausência de cura nos animais infectados do presente estudo (SCIUTTO et al. 1995; WILLMS & ZURABIAN, 2010; FRAGOSO et al. 2008; TERRAZAS 2008; FREITAS et al. 2012; PÉON, ESPINOZA-JIMENES, TERRAZAS, 2013).

O granuloma observado neste estudo pode ser comparado à cisticercose por *T. solium* em humanos, como Nigam & Sharma (2013) descreveram nódulo de cisticercose subcutânea composto por um infiltrado de células inflamatórias incluindo neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e histiócitos, envolvidas em material fibrilar. De forma semelhante, Gupta, Panchonia, Jain (2014) relataram lesão cística em mama causada por cisticercos de *T. solium*. Esses dados reforçam a aplicabilidade deste modelo experimental para o estudo da cisticercose.

Na neurocisticercose, a inflamação granulomatosa formada em torno do cisticerco caracteriza-se pela presença de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e demais células inflamatórias, que destroem o parasito, e o nódulo possivelmente é calcificado (DEL BRUTTO & SOTELO, 1988). Em amostras de biópsias de neurocisticercose por *T. solium* em seres humanos, Restrepo et al. (2001) descreveram a formação de um granuloma maduro em torno do parasito, semelhante ao descrito para o subcutâneo, com presença de angiogênese, fibrose e infiltrado inflamatório, composto principalmente por plasmócitos, linfócitos B e T, macrófagos, e mastócitos. Com relação ao perfil de citocinas envolvido no desenvolvimento do granuloma, todas as amostras tinham presença simultânea de citocinas Th1 e Th2, melhor identificadas em células mononucleares do infiltrado inflamatório.

Os animais IL-4-KO apresentaram inflamação aguda exsudativa purulenta moderada aos 30 e acentuada aos 90 DAI à macroscopia, somadas a uma acentuada intensidade de neutrófilos à microscopia; diferente dos animais WT que apresentavam essa alteração em menor intensidade. Aos 30 DAI, observou-se a presença de fibrina, tecido de granulação e hiperemia predominantemente nos animais IL-4-KO em relação aos animais WT. Essas alterações são compatíveis a um perfil inflamatório agudo mais persistente, provavelmente resultante da atuação mais acentuada de outros perfis celulares de resposta imune nos animais IL-4-KO. A IL-17 e a resposta Th17 têm participação importante no recrutamento e ativação de neutrófilos, e possivelmente podem estar atuando nesses animais (WEAVER et al. 2007).

Entre os aspectos microscópicos observados neste estudo, o edema foi encontrado com maior intensidade na fase aguda da inflamação, e subsequente diminuição aos 30, 60 e 90 DAI em ambas as linhagens. Sabe-se que os principais eventos na fase aguda são a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a migração celular e a dor, ocorrendo como consequência da liberação de mediadores químicos tais como as cininas, polipeptídeos gerados rapidamente a partir da lesão tecidual (CHAMUSCA et al. 2012).

Em todos os dias experimentais nos animais IL-4-KO, os eosinófilos se encontraram bem diminuídos em relação aos animais WT, e houve diferença estatisticamente significativa aos 30 e 90 DAI entre as linhagens. Sabe-se que há relação de retroalimentação positiva entre a resposta imunológica Th2 e a presença de eosinófilos. Avaliações realizadas em modelos experimentais mostram que a ausência

de eosinófilos está acompanhada por uma resposta Th2 atenuada (SPENCER & WELLER, 2010), confirmando o observado no presente trabalho.

Macrófagos espumosos foram observados em ambas as linhagens, aos 60 e 90 DAI, entretanto cristais de colesterol foram encontrados apenas nos animais WT. Os macrófagos podem acumular no seu interior colesterol e seus ésteres, e passam a ser denominados xantomizados ou espumosos, pelo aspecto “espumoso” de seu citoplasma devido à presença de corpúsculos lipídicos. Estes lipídios podem ser provenientes do tegumento do parasito, visto que nesta fase há presença de cisticercos em destruição tanto nos animais IL-4-KO quanto nos WT. Segundo Vinaud (2007), a maioria dos helmintos é incapaz de sintetizar lipídeos, e dependem da absorção destes por fontes exógenas; os cestódeos após a absorção, rapidamente incorporam esses lipídeos à sua membrana cística e tegumento. Como descrito nesse estudo, o acúmulo de corpúsculos lipídicos tem sido observado no citoplasma de células ativadas associadas a várias condições inflamatórias e infecciosas, *in vivo* e *in vitro*. Estudos demonstram que os corpúsculos lipídicos são organelas celulares ativas, relacionadas a diversas condições inflamatórias, e funcionam como sítios para a síntese e armazenamento de mediadores inflamatórios (eicosanóides) (MELO et al. 2011; MELO & DVORAK; 2012).

Assim como observado no presente estudo, sabe-se que camundongos BALB/c infectados por *T. crassiceps* desenvolvem uma resposta imune mista Th1/Th2. Quando a infecção progride para a fase crônica, a presença de citocinas Th2 resulta no recrutamento de macrófagos alternativamente ativados, que controlam a resposta inflamatória exacerbada (MARTINEZ, HELMING, GORDON, 2009). Macrófagos alternativamente ativados neutralizam citocinas pró-inflamatórias e mecanismos imunes efetores, funcionando como reguladores inibitórios, modulando a resposta. Esses macrófagos secretam componentes da matriz extracelular e estão relacionados à fibrose e reparação tecidual, e podem ter contribuído para diminuir a resposta inflamatória exacerbada nos animais de nosso estudo (KREIDER et al. 2007; MOSSER & EDWARDS, 2008; GORDON & MARTINEZ, 2010).

Neste presente trabalho, animais WT em produção espontânea de IFN γ mais elevada nos infectados com relação aos controles, aos 07, 30 e 60 DAI. Estudos de Spolski et al. (2000), com infecção intraperitoneal por *T. crassiceps* em BALB/c, observaram que células produtoras de IFN γ estão presentes nos estágios mais precoces da infecção, atuando na destruição do parasito de forma mais efetiva.

As células de animais WT controle estimuladas com ConA produziram mais IFN γ que infectados (07, 30 e 90 DAI); diferentemente dos animais IL-4-KO que quando estimulados com ConA tiveram os níveis de IFN γ semelhantes entre Controle e Infectado. Com esses dados pode-se inferir que há uma tendência dos animais IL-4-KO a desenvolverem uma resposta Th1 mais acentuada, com maior produção de IFN γ , provavelmente em virtude do comprometimento da resposta Th2. Freitas et al. (2012) encontraram em camundongos C57BL/6, um perfil mais resistente à cisticercose experimentalmente induzida no subcutâneo por *T. crassiceps*, onde esses animais apresentaram maiores níveis de IFN γ ao longo da infecção, o que corrobora com nosso estudo, que utilizou animais BALB/c, considerados mais susceptíveis à doença, e por consequência com menores níveis de IFN γ durante o curso da infecção.

Os animais IL-4-KO do presente estudo provavelmente desenvolveram uma resposta Th1 e/ou outro perfil de resposta mais intenso pela deficiência de IL-4.. Isso pode ser atestado pelos níveis de IFN γ encontrados nos animais IL-4-KO controle que produziram IFN γ de forma semelhante aos infectados quando estimulados com ConA. Apesar disso, a produção de IFN γ não foi suficiente para aumentar a resistência à infecção ou diminuir a carga parasitária. Em infecção intraperitoneal com cisticercos de *T. crassiceps* em camundongos fêmeas BALB/c, o parasito foi capaz de polarizar a resposta imune do hospedeiro para um perfil do tipo Th2, por ativação da via de sinalização STAT6, com consequente elevação de IL-4 e IL-13, e uma diminuição na produção de IFN- γ e os níveis séricos de IL-12 após seis semanas de inoculação (LÓPEZ-NAVARRETE et al. 2011). Alonso-Trujillo et al. (2007) observaram que, em infecção intraperitoneal com *T. crassiceps*, camundongos BALB/c WT desenvolveram uma forte resposta Th2, com níveis elevados de IgE, IgG1, IL-5, IL-4, e níveis discretos de óxido nítrico. Em contraste, BALB/c deficientes em STAT6 (STAT6^{-/-}) modularam uma forte resposta Th1, com níveis elevados de IgG2a, IFN- γ , e IL-17.

Com relação à concentração de IL-4 entre os animais WT, neste estudo observou-se aumento de IL-4 no grupo infectado com relação ao controle (07, 30 e 60 DAI), nas culturas com estimulação com ConA. Logo, há uma tendência à produção de IL-4 pelos animais WT infectados. Péon, Espinoza-Jimenes, Terrazas, (2013) relataram que, na fase aguda, a infecção murina por *T. crassiceps* induz uma resposta Th1 com produção intensa de IFN γ nas primeiras semanas, que é substituída por resposta Th2 predominante nos próximos meses, rica em IL-4/IL-13. Isso corrobora com os resultados encontrados neste trabalho para a linhagem WT.

Os animais WT apresentaram diferença significativa na concentração de IL-10 nas amostras com estimulação com ConA, quando comparados controle *vs* infectado aos 07, 30 e 90 DAI. Os animais IL-4-KO infectados quando estimulados com ConA apresentaram maior concentração de IL-10 que WT aos 07 DAI. Em produção espontânea, animais IL-4-KO diminuíram sua produção de IL-10 nos infectados com relação aos controles aos 30 e 90 DAI. Esses dados sugerem que há possivelmente uma participação de IL-10 no curso da infecção. A IL-10, produzida principalmente por células Th2, Treg, Th1, é um potente inibidor de apresentação antigênica e de produção de mediadores e citocinas pró-inflamatórias de macrófagos, DCs e células Th1. A IL-10 tem um papel regulador importante sobre a resposta inflamatória do hospedeiro durante a infecção; a inflamação é essencial no início, mas se não for controlada pode resultar em complicações inflamatórias, doenças auto-imunes e até mesmo alguns tipos de câncer. Dessa forma, a produção de IL-10 pode contribuir para a sobrevivência do patógeno e estabelecimento de uma infecção persistente (TERRAZAS et al. 1998; MOSSER & ZHANG, 2008; HEDRICH & BREM, 2010; MARTINEZ & GORDON, 2014).

Quanto à quantificação de colágeno presente nas vesículas, não houve diferença estatisticamente significativa no decorrer dos dias experimentais e nem entre as duas linhagens. Acredita-se que outras citocinas do perfil Th2, como IL-13, estejam modulando a resposta inflamatória nos animais IL-4-KO, uma vez que a fibrose e a cicatrização não estiveram comprometidas nesses animais. Sabe-se que IL-13 pode contribuir para fibrose, e em nosso estudo animais IL-4-KO apresentaram produção espontânea de IL-13 maior que os WT em animais infectados aos 30 DAI (ANTHONY et al. 2007; BURKE et al. 2009).

Com a deficiência de IL-4, possivelmente outros perfis celulares sejam induzidos para auxílio na resposta frente ao parasito nos animais IL-4-KO. As helmintoses podem induzir a diferenciação de populações de células T reguladoras, e o aumento central e periférico de células Tregs têm sido observado em pacientes com NCC grave. Essas células podem contribuir controlando a infecção, pelos seus mecanismos de regulação do sistema imune, e ao mesmo tempo promover um ambiente permissivo para persistência da infecção (ADALID-PERALTA et al. 2013). Estudos com o perfil Th9 e a IL-9 têm mostrado seu papel importante na eliminação de parasitos, com intensa basofilia, aumento do número de mastócitos e outros mecanismos efetores durante a resposta (WANG, CAO, SHI, 2008; LICONA-LIMÓN et al. 2013).

No presente estudo, camundongos BALB/c convencionais infectados desenvolveram infecção crônica granulomatosa ao longo dos dias experimentais, com presença de infiltrado inflamatório macrofágico e linfoplasmocitário aos 90 DAI. Animais WT infectados com estimulação com ConA apresentaram tendência a aumentar a concentração de IL-4, e diminuir os níveis de IFN γ . Observou-se nesses animais um padrão de resposta misto, com produção inicial aumentada de IFN γ - resposta Th1, que evoluiu para a cronicidade com uma resposta Th2 acentuada e presença de IL-10, modulando a resposta inflamatória e favorecendo a instalação do parasito.

Camundongos BALB/c IL-4-KO infectados desenvolveram granuloma com a presença de infiltrado inflamatório macrofágico, porém, ainda com características de inflamação aguda persistentes em decorrência da presença de polimorfonucleares aos 90 DAI. A linhagem IL-4-KO demonstrou um perfil de resposta Th1 mais acentuado com aumento da produção de IFN γ , e co-expressão de IL-10, que inibe a resposta Th1 acentuada e contribui para persistência da infecção.

7 CONCLUSÕES

Observou-se, no sítio da infecção por cisticercos de *T. crassiceps*, o desenvolvimento de um granuloma nas duas linhagens de animais, caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório macrofágico e linfoplasmocitário nos animais convencionais, acompanhado de aumento de IFN γ inicialmente, evoluindo para resposta Th2 predominante, o que favorece a instalação do parasito, pela imunomodulação; e macrofágico e polimorfonuclear com sinais de inflamação aguda persistente, associado ao aumento nos níveis de IFN γ , e resposta Th1 mais acentuada nos animais deficientes para IL-4 ao término dos dias experimentais. A presença de IL-10 nas duas linhagens provavelmente contribuiu para a inibição da resposta inflamatória acentuada e persistência da infecção.

A deficiência de IL-4 direcionou a inflamação para um maior potencial microbicida, destruição do parasito já nos primeiros dias de infecção, e redução significativa de eosinófilos. Fibrose e reparação tecidual não estiveram comprometidas durante os dias experimentais. A produção de IL-13 aumentada em animais deficientes para IL-4 aos 30 dias de infecção demonstra possível participação desta citocina na resposta Th2 frente à infecção.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular Molecular**. 7ª ed. p. 269-292. Elsevier Editora, 2011.
- ACHA, P., SZIFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a Los Animales**. 2ª ed. Washington: OPS/OMS, 1986.
- ADALID-PERALTA, L; ARCE-SILLAS, A.; FRAGOSO, G.; CÁRDENAS, G.; ROSETTI, M.; CASANOVA-HERNÁNDEZ, D.; RANGEL-ESCAREÑO, C.; URIBE-FIGUEROA, L.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E. Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote In Vitro and In Vivo Tregs Differentiation. **Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p.1-9, 2013.
- AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n.3-B, p. 822-828, 2003.
- AGRAWAL, R. Soft tissue cysticercosis: study of 21 cases. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 6, n. 10, p. 1669–71, 2012.
- ALE, A.; VICTOR, B.; PRAET, N.; GABRIËL, S.; SPEYBROECK, N.; DORNY, P.; DEVLEESSCHAUWER, B. Epidemiology and genetic diversity of *Taenia asiatica*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 7, p.1-11, 2014.
- ALONSO-TRUJILLO, J., RIVERA-MONTOYA, I., RODRÍGUEZ-SOSA, M., & TERRAZAS, L. I. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1341–50, 2007.
- ANDRADE, E.C.; LEITE, I.C.G.; RODRIGUES, V.O.; CESCO, M.G. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, Juiz de Fora, v.13, n.2, p.231-240, 2010.
- ANTHONY, M.R.; RUTITZKY I.L.; URBAN, J.F.; STADECKER, M.J.; GAUSE, W.C. Protective immune mechanisms in Helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 975-987, 2007.
- BANGERT, C.; BRUNNER, P.M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 360–376, 2011.
- BOURKE, C.D.; MAIZELS, R.M.; MUTAPI, F. Acquired immune heterogeneity and its sources in human helminth infection. **Parasitology**, v. 138, p. 139–159, 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo – Patologia**. 8^a ed. p. 183-216, Guanabara Koogan, 2011.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; MCMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163–76, 2009.

CAMPBELL, G.; GARCIA, H.H.; NAKAO, M.; ITO, A.; CRAIG, P.S. Genetic variation in *Taenia solium*. **Parasitology International**, v. 55, p. S121 – S126, 2006.

CAIXETA, L.; CAIXETA, M.; ALMEIDA-NETO, J.C. Neurocisticercose: forma psíquica e demência. **Revista de Patologia Tropical**, IPTSP-UFG, v. 33, n. 1, p. 33-44, 2004.

CHAMUSCA, F. V.; REIS, S. R. E.; LEMAIRE, D.; MEDRADO, A. P. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras : uma revisão de literatura. **Revistas de Ciências Médicas e Biológicas**. p. 70–78, 2012.

CHERMETTE, R.; BUSSIÉRAS, J.; MARIONNEAU, J.; BOYER, E.; ROUBIN, C.; PROPHETTE, B.; MAILLARD, H.; FABIANI, B. Invasive cysticercosis due to *Taenia crassiceps* in an AIDS patient. **Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine**, v. 179, n. 4, 777-80, 780-3, 1995.

CHIMELLI, L.; LOVALHO, A.F.; TAKAYANAGUI, O.M. Neurocisticercose. Contribuição da necrópsia na consolidação da notificação compulsória em Ribeirão Preto-SP. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3-B, p. 577-584, 1998.

DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J. Neurocysticercosis: an update. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n.6, p.1075-1087, 1988.

DENT, A.L.; HU-LI, J.; PAUL, W.E.; STAUDT, L.M. T helper type 2 inflammatory disease in the absence of interleukin 4 and transcription factor STAT6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13823–13828, 1998.

DUONG, T.H., MONGERDIEU, S.C., BAILLY, E.R., GUILLOU-GARNIER, M.F., FETISSOF, F., RICHARD-LENOBLE, D. Cysticercosis contracted in metropolitan France. **Presse Medicine**, v.35, p. 243–245, 2006.

DUPASQUIER, M.; STOITZNER, P.; OUDENAREN, A.; ROMANI, N.; LEENEN, P. J.M. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. **The Society for Investigative Dermatology**. v. 123, p. 876- 879, 2004.

DYER, N.W.; GREEVE, J.H. Severe *Cysticercus Longicollis* Cysticercosis in a Black Lemur (*Eulemur Macaco Macaco*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 362-364, 1998.

- FLAMME, A.C.L.; PATTON, E.A.; PEARCE, E.J. Role of Gamma Interferon in the Pathogenesis of Severe Schistosomiasis in Interleukin-4-Deficient Mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7445–7452, 2001.
- FLISSER, A.; PÉREZ-MONTFORT; LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v.57, n.5, p. 839-856, 1979.
- FLISSER, A. Taeniasis-Cysticercosis: An Introduction. **Supplement to The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 22, p.233-235, 1991.
- FLISSER, A.; MADRAZO, I.; DELGADO, H. **Cisticercosys Humana**. Edição única. El Manual Moderno, 1997.
- FRAGOSO G.; MENESES G.; SCIUTTO E.; FLEURY A.; LARRALDE C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasites lines. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 551-553, 2008.
- FRANÇOIS, A.; FAVENNEC, L.; CAMBON-MICHOT, C.; GUEIT, I.; BIGA, N.; TRON, F.; BRASSEUR, P.; HEMET, J. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 4, p. 488-492, 1998.
- FRANSSSEN, F.; NIJSSE, R.; MULDER, J.; CREMERS, H.; DAM, C.; TAKUMI, K.; VAN DER GIESSEN, J. Increase in number of helminth species from Dutch red foxes over a 35-year period. **Parasites & Vectors**, v.7, n.166, p.1-10, 2014.
- FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, p. 969-990, 1962.
- FREEMAN, R.S., FALLIS, M., SHEA, M., MABERLEY, A.L., WALTERS, J. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). Part II. The parasite. **The American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v. 22, p. 493-495, 1973.
- FREITAS, A.A.; MOURA, V. B. L.; GONÇALVES, S. F.; FÉLIX, R. M.; SOARES, T. P.; IRUSTA, V. R. C.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; LINO-JUNIOR, R.S. Kinetics of the Inflammatory Response in Subcutaneous Cysticercosis Induced in Mice by *Taenia crassiceps*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, 2-3 ed., p. 267-274, 2012.
- GARCÍA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, v. 361, p. 547-556, 2003.

- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p. 23-35, 2003.
- GORDON S.; MARTINEZ. F.O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Cell Presse Immunity Review Immunity**, v. 32, p. 593-604, 2010.
- GUPTA, N. K.; PANCHONIA, A.; JAIN, D. Cysticercosis of breast. **Tropical Parasitology**, v. 3, p. 148-150, 2014.
- GUSSO, R. L. F. **Estudo comparativo dos antígenos de *Cysticercus longicollis* e *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2000.
- HARNETT, W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. **Molecular & Biochemical Parasitology**, n.14, S0166-6851, 2014.
- HEDRICH, C.M. & BREAM, J.H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 185–206, 2010.
- HELDWEIN, K.; BIEDERMANN, H. G.; HAMPERI, W. D.; BRETZEL, G.; LOSCHER, T.; LAREGINA, D.; FROSCH, M.; BUTTNER, D.W.; TAPPE, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-hodgkin's lymphoma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 108-111, 2006.
- IASBIK, A.F.; PINTO, P.S.A.; BEVILACQUA, P.D.; NERO, L.A.; SANTOS, T.O.; FELIPPE, A.G. Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural do município de Viçosa, Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1664-1667, 2010.
- JACKSON, A.J.; FRIBERG, M.I.; LITTLE, S.; BRADLEY, E.J. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunology**, v. 126, p. 18–27, 2008.
- JEON, H.K.; EOM, K.S. *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: Genetic divergence estimated from their mitochondrial genomes. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 58–61, 2006.
- KRAFT, R. Cysticercosis: An Emerging Parasitic Disease. **American Family Physician**, v. 76, n. 1, p. 91-96, 2007.
- KONO, H.; ROCK, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 279-289, 2008.

- KREIDER, T.; ANTHONY, R. M.; URBAN, J. F.; & GAUSE, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 4, p. 448–53, 2007.
- KUNZ, J.; KALLINA, B.; WATSCHKE, V. GEYVER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 271, p. 510-20, 1989.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. p. 49-88, Elsevier, 2005.
- LICONA-LIMÓN, P.; HENAO-MEJIA, J.; TEMANN, A.U.; GAGLIANI, N.; LICONA-LIMÓN, I.; ISHIGAME, H.; HAO, L.; HERBERT, D.R.; FLAVELL, R.A. Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. **Cell Press Immunity**, v. 39, p. 744–757, 2013.
- LINO-JÚNIOR, R.S.; RIBEIRO, P.M.; ANTONELLI, E.J.; FALEIROS, A.C.G; TERRA, S.A.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração humanos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.617-622, 2002.
- LÓPEZ-MORENO, H.S. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. **Salud Pública de México**, v. 44, n. 2, 2002.
- LÓPEZ-NAVARRETE, G.; RAMOS-MARTÍNEZ E.; SUÁREZ-ÁLVAREZ K.; AGUIRRE-GARCÍA J.; LEDEZMA-SOTO Y.; LEÓN-CABRERA S.; GUDIÑO-ZAYAS M.; GUZMÁN C.; GUTIÉR-REZ-REYES G.; HERNÁNDEZ-RUÍZ J.; CAMACHO-ARROYO I.; ROBLES-DÍAZ G.; KERSHE-NOBICH D.; TERRAZAS L.I.; ESCOBEDO G. Th2-associated alternative Kupffer cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. **International Journal of Biological Sciences**. v. 7, n. 9, p. 1273–86, 2011.
- LUSTIGMAN, S.; PRICHARD, R.K.; GAZZINELLI, A.; GRANT, W.N.; BOATIN, B.A.; MCCARTHY, J.S.; BASÁÑEZ M.G. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1582 (1-13), 2012.
- LUZINA, I.G.; KEEGAN, A.D.; HELLER, N.M.; ROOK, G.A.W.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 753–764, 2012.

MABLESON, H. E.; OKELLO, A.; PICOZZI, K.; WELBURN, S.C. Neglected Zoonotic Diseases—The Long and Winding Road to Advocacy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.6, p.1-5, 2014.

MACHADO, R.C.; MARCARI, E.L.; CRISTANTE, S.F.V.; CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 697-704, 1999.

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

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.451-83, 2009.

MARZAL, M.; GUERRA-GIRALDEZ, C.; PAREDES, A.; CANGALAYA, C.; RIVERA, A.; GONZALEZ, A.; MAHANTY, S.; GARCIA, H.H.; NASH, T.E.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Evans Blue Staining Reveals Vascular Leakage Associated with Focal Areas of Host-Parasite Interaction in Brains of Pigs Infected with *Taenia solium*. **PLoS One**, v.9, n.6, p.1-9, 2014.

MATOS-SILVA, H.; RECIPUTTI, B.P.; PAULA, E.C.; OLIVEIRA, A.L.; MOURA, V.B.L.; VINAUD, M.C.; OLIVEIRA, M.A.P.; LINO-JÚNIOR, R.S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 4, p. 287-292, 2012.

MCSORLEY, H.J.; HEWITSON, J.P.; MAIZELS, R.M. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 301–310, 2013.

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

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

MOONEY, K.A.; SPOLSKI, R.J.; SEE, E.J.; KUHN, R.E. Immune Destruction of Larval *Taenia crassiceps* in Mice. **Infection and Immunity**, p. 2393–2401, 2000.

MOURA, V.B.L.; SILVA, M.M.; BATISTA, L.F.; GOMES, C.M.; LEENEN, P.J.M.; LINO-JR. R.S.; OLIVEIRA, M.A.P. Arginase activity is associated with fibrosis in experimental infection with *Taenia crassiceps*, but does not play a major role in resistance to infection. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 599–605, 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–69, 2008.

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 205–218, 2008.

NIGAM, J.S.; SHARMA, A. Fine Needle Aspiration Cytology of Cysticercosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.12, p. 3123, 2013.

OLIVARES, Maria Conceição de Menezes Fernandes Varela; SANTOS, Edna Ribeiro dos. **Enriquecimento ambiental em biotério**: avaliação da aplicabilidade e elaboração de cartilha. Anais do III Encontro Nacional de Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente, 2012.

OLIVEIRA, M.A.P.; SANTIAGO, C.H.; LISBOA, R.C.; CERAVOLLO, P.I.; TRINCHIERI, G.; GAZINELLI, T.R.; VIEIRA, Q.L. *Leishmania* sp: Comparative Study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in Their Ability to Initialize IL-12 and IFN-g Synthesis. **Experimental Parasitology**, v. 95. p. 96-105, 2000.

OLIVEIRA, M.A.P.; TADOKORO, E.C.; LIMA, M.C.A.G.; MOSCA, T.; VIEIRA, Q.L.; LEENEN, J.M.P.; ABRAHAMSOHN, A.I. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high level of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 213-223, 2005.

PÉON, A. N.; ESPINOZA-JIMENES, A.; TERRAZAS, L. I. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

PFUETZENREITER, M. R.; ÁVILA-PIRES, F. D. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 541-548, 2000.

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

RESTREPO, B.I.; ALVAREZ, J.I.; CASTAÑO, J.A.; ARIAS, L.F.; RESTREPO, M.; TRUJILLO, J.; COLEGIAL, C.H.; TEALE, J.M. Brain Granulomas in Neurocysticercosis Patients Are Associated with a Th1 and Th2 Profile. **Infection and Immunity**, v.69, n.7, 4554- 4560, 2001.

ROBINSON, P.; ATMAR, R.L.; LEWIS, D.E.; WHITE, A.C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. **Infection and Immunity**, v.65, p.2925-2931, 1997.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; BACA, M.; DE LA CRUZ, V.; LEMUS, L.; LAMOYI, E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. **Infection and Immunity**, v.63, n.6, p. 2277-2281, 1995.

SERHAN, C.N.; BRAIN, S.D.; BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L.A.J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G.; WALLACE, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB Journal**, v.21, p.325-332, 2007.

SPENCER, L. A; WELLER, P. F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. **Immunology and cell biology**, v. 88, n. 3, p. 250–6, 2010.

SPOLSKI, R.J.; CORSON, J.; THOMAS, P.G.; KUHN, R.E. Parasite secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. **Parasite Immunology**, v.22: p. 297-305, 2000.

SPOLSKI, R.J.; THOMAS, P.G.; SEE, E.J.; MOONEY KA, KUHN RE. Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon-gamma. **Parasitology Research**, v.88, n.5, p.431-438, 2002.

TAKAYANAGUI, O.M.; CASTRO E SILVA, A.A.M.C.; SANTIAGO, R.C.; ODASHIMA, N.S.; TERRA, V.C.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Notificação compulsória da cisticercose em Ribeirão Preto - SP. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.54, n.4, p. 557-564, 1996.

TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Neurocisticercose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 283-290, 2001.

TAY, S.S.; ROEDIGER, B.; TONG, P.L.; TIKOO, S.; WENINGER, W. The Skin-Resident Immune Network. **Current Dermatology Reports**, v.3, p.13-22, 2014.

TAYLOR, M.D.; WERF, N.V.D.; MAIZELS, R.M. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p.181-189, 2012.

TERRAZAS, L.I.; BOJALIL, R.; GOVEZENSKY, T.; LARRALDE, C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 1; p. 74-81, 1998.

TERRAZAS I.L. The Complex Role of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Cysticercosis: Immunological Lessons from Experimental and Natural Hosts. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 383-392, 2008.

TOGORO, S. Y.; SOUZA, E. M.; SATO, N. S. Diagnóstico laboratorial da Neurocisticercose: revisão e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p 345-355, 2012.

TSAI, I.J.; ZAROWIECKI, M.; HOLROYD, N.; GARCIARRUBIO, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; BROOKS, K.L.; TRACEY, A.; BOBES, R.J.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; ASLETT, M.; BEASLEY, H.; BENNETT, H.M.; CAI, J.; CAMICIA, F.; CLARK, R.; CUCHER, M.; SILVA, N.; DAY, T.A.; DEPLAZES, P.; ESTRADA, K.; FERNANDEZ, C.; HOLLAND, P.W.H.; HOU, J.; HU, S.; HUCKVALE, T.; HUNG, S.S.; KAMENETZKY, L.; KEANE, J.A.; KISS, F.; KOZIOL, U.; LAMBERT, O.; LIU, K.; LUO, X.; LUO, Y.; MACCHIAROLI, N.; NICHOL, S.; PAPS, J.; PARKINSON, J.; POUCHKINA-STANTCHEVA, N.; RIDDIFORD, N.; ROSENZVIT, M.; SALINAS, G.; WASMUTH, J.D.; ZAMANIAN, M.; ZHENG, Y.; CAI, X.; SOBERON, X.; OLSON, P.D.; LACLETTE, J.P.; BREHM, K.; BERRIMAN, M. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitismo. **Nature**, v. 496; p. 57-63, 2013.

UTHIDA-TANAKA, A.M.; SAMPAIO, M.C.A.; VELHO, P.E.N.F.; DAMASCENO, B.P.; CINTRA, M.L.; MORAES, A.M.; ZANARDI, V. Subcutaneous and cerebral cysticercosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 2, p. S14-S17, 2004.

VAIDYA, A.; SINGHAL, S.; DHALL, S.; MANOHAR, A.; MAHAJAN, H. Asymptomatic Disseminated Cysticercosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p. 1761-1763, 2013.

VAZ, A. J.; NUNES, C. M.; PIAZZA, R. M. F.; LIVRAMENTO, A. J.; SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; FERREIRA, W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n.3, p. 354-357, 1997.

VERMA, R.; SHARMA, P.; KHURANA, N. Images in Clinical Tropical Medicine: Thousands of Lesions in Disseminated Cysticercosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 583, 2011.

VIANNA, L. G.; MACEDO, V; COSTA, J.M. Cisticercose músculo-cutânea e visceral-doença rara? **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 129-136, 1991.

VIDAL, S. Comunicación de un caso de cisticercosis subcutânea. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 30, n. 3, p. 323-325, 2013.

- VINAUD, Marina Clare. **Vias do metabolismo energético e respiratório em cisticercos de *Taenia crassiceps* in vivo e seu estudo in vitro sob a ação de fármacos anti-helmínticos.** 2007. 92pp. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.
- VINAUD, M.C.; LINO, R. DE S.J.R, BEZERRA, J.C. *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. **Experimental Parasitology**, v.116, n.4, p.335-9, 2007.
- WANG, L.J.; CAO, Y.; SHI, H.N. Helminth infections and intestinal inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 33, p. 5125-5132, 2008.
- WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p.821–852, 2007.
- WILLMS, K.; ZURABIAN, R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. **Parasitology**, v. 137, n.3, p.335-46, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2011. **Report of the WHO Expert Consultation on Foodborne Trematode Infections and Taeniasis/Cysticercosis.** Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_HTM_NTD_PCT_2011.3.pdf>. Acesso em 18/06/2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2013. **Neglected tropical diseases: Cysticercosis / Teniasis.** Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/cysticercosis/en/index.html>. Acesso em 18/06/2013.
- WUNSCHMANN, A.; GARLIE, V.; AVERBECK, G.; KURTZ, H.; HOBERG, E.P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 484–488, 2003.
- YAN, HONG-BIN; LOU, ZHONG-ZI; LI, L.; BRINDLEY, P.J.; ZHENG, Y.; LUO,X.; HOU, J.; GUO, A.; JIA, WAN-ZHONG; CAI, X. Genome-wide analysis of regulatory proteases sequences identified through bioinformatics data mining in *Taenia solium*. **BMC Genomics**, v.15, p.1-13, 2014.

Anexo – Parecer CEUA/UFG N.076/12



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 14/01/ 2013

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O N. 076/12

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino)

Projeto de pesquisa

II - Identificação:

Título do projeto:

Avaliação da resposta inflamatória local e sistêmica em modelo experimental de cisticercose subcutânea por *Taenia crassiceps* nas linhagens BALB/c selvagem e deficiente para o gene de IL-4

Pesquisador Responsável/ Unidade: Ruy de Souza Lino Júnior- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPSTP-UFG

❑ Pesquisadores Participantes:

Sarah Buzaim Lima
Vânia Beatriz Lopes Moura
Milton Adriano Pelli de Oliveira
Aline de Araújo Freitas
Izabela Maciel Saraiva

Unidade onde será realizado: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPSTP-UFG

❑ **Data de apresentação ao CEUA:** 27.11.12

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo geral:

Caracterizar a resposta imune (local e sistêmica) em camundongos BALB/c convencionais e deficientes do gene de IL-4, decorrente da infecção no subcutâneo por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Objetivos Específicos:

Avaliar processos patológicos gerais presentes no subcutâneo infectado.

Avaliar as alterações na presença das células mononucleares CD301+ e F4/80+ do sistema imunológico, no subcutâneo de animais infectados, por meio de imunistoquímica

Avaliar a concentração sérica das citocinas Interleucina-4 e Interleucina-10, juntamente com o Interferon-gama, que estão associadas ao processo inflamatório sistêmico.

Justificativa

Com relação ao estudo da cisticercose, faz-se necessário identificar o perfil imune adequado para limitar o crescimento/desenvolvimento parasitário, na tentativa também de diminuir o dano tecidual e

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua ufg@gmail.com



orgânico ao hospedeiro. Este estudo propõe um modelo experimental no subcutâneo, semelhante ao que ocorre em seres humanos e em animais; modelo que possibilita uma comparação com a cisticercose humana causada por *T.solium*, que acomete predominantemente o subcutâneo.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:

O estudo "in vivo" possibilita o acompanhamento do local infectado e o desenvolvimento da resposta inflamatória ao longo do tempo, seja por métodos anatomopatológicos, imunohistoquímicos, entre outros que permitam expressar dados relevantes da evolução da doença e da resposta imune frente ao parasita. Os autores afirmam não foram encontrados métodos alternativos para tal pesquisa.

Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):

Serão utilizados 120 camundongos machos isogênicos das linhagens BALB/c deficientes e não deficientes do gene de IL-4 com 8 a 12 semanas de idade, pesando de 20 a 30 gramas, fornecidos e mantidos no Biotério do IPTSP-UFG (termo de consentimento anexado ao processo).

Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do Ambiente (ar, temperatura, umidade), Alimentação/hidratação:

Os animais serão alojados em gaiolas (6 animais por gaiola) apropriadas para camundongos 20x30 cm no Biotério do IPTSP-UFG. Será realizada uma adaptação dos animais ao ambiente proposto, priorizando o bem estar, de forma que as gaiolas ficarão próximas, uma de frente para a outra, com isso, diminuindo o estresse entre os animais. A luminosidade (fotoperíodo de 12 h) e a temperatura são controladas, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar serão as do ambiente geral. Serão colocados 6 animais por gaiola, recebendo água *ad libitum* e ração comercial autoclavada para a espécie à vontade e as trocas das camas serão realizadas duas vezes por semana.

Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:

Os animais serão infectados por via subcutânea por 10 cisticercos em fase inicial de *Taenia crassiceps*, mas os autores apresentam uma clara metodologia para amenizar o sofrimento proveniente dos efeitos da infecção, como descrito no tópico a seguir.

Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:

Os animais submetidos ao inóculo serão acompanhados (dor e/ou sofrimento) por um Médico Veterinário e receberão medicamento analgésico: Tramadol, nos sete primeiros dias após a inoculação. Após esse período inicial a medicação será suspensa, entretanto, caso os animais apresentem sintomatologia que indique dor e/ou sofrimento serão eutanasiados. Para observar a frequência da dor será utilizada a avaliação do comportamento desses animais na gaiola e no momento da manipulação (RIVERA, 2002); como por exemplo: higiene pessoal, agressividade, postura e respostas ao manejo.

Para punção cardíaca que precederá a eutanásia, os animais serão anestesiados intraperitonealmente com 0,1g/mL da solução de Xilazina a 2% e Cetamina a 10%.

Método de eutanásia:

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP.74001-970, Goiânia - Goiás, Fone. (55-62) 3521-1215.

Email: ceua ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Os animais serão eutanasiados por deslocamento cervical, conforme os métodos previstos pela Resolução CFMV nº 1000 de 11 de maio de 2012.

Destino do animal:

Segundos os autores, após a eutanásia, esses animais serão preservados em freezer a -20oC, descartados e incinerados na Escola de Veterinária da UFG.

IV – Comentários do relator frente às orientações da SBCAL

Estrutura do protocolo:

O protocolo contém todos os elementos necessários à sua análise. O cronograma está adequado e o orçamento está detalhado, sendo que IPTSP/UFG já possui todos os insumos e equipamentos necessários.

Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:

A equipe é experiente, multidisciplinar e já realizou pesquisas ligadas ao tema. Conta com acompanhamento veterinário e apresenta um protocolo adequado para aliviar os possíveis sofrimentos impostos pela infecção dos animais.

O perfil da análise, como proposto nos objetivos demanda realmente o uso de animais em detrimento a outras técnicas, como estudo “*in vitro*”.

Como benefício, o estudo propõe um modelo experimental no subcutâneo, semelhante ao que ocorre em seres humanos e em animais; modelo que possibilita uma comparação com a cisticercose humana causada por *T.solium*, que acomete predominantemente o subcutâneo.

Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:

O manuseio de camundongos infectados por *Taenia crassiceps* pode levar, de forma acidental, a infecção dos pesquisadores, tanto no momento de inoculação dos cisticercos, quanto no momento da eutanásia do animal e retirada do material para análise. Para minimizar o risco biológico, todos os pesquisadores utilizarão equipamentos de proteção individual (EPI).

Necessidade do número de animais:

Serão formados quatro grupos de camundongos, contendo 30 camundongos cada e para cada período de estudo (7, 30, 60, 90 e 120 dias pós-inóculo) serão utilizados grupos contendo seis animais cada permitindo assim a realização da análise estatística.

V - Parecer do CEUA:

De acordo com a documentação apresentada a este comitê consideramos o projeto **APROVADO**, smj deste Comitê.

VI - Data da reunião: 14/01/2013

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP.74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua ufg@gmail.com