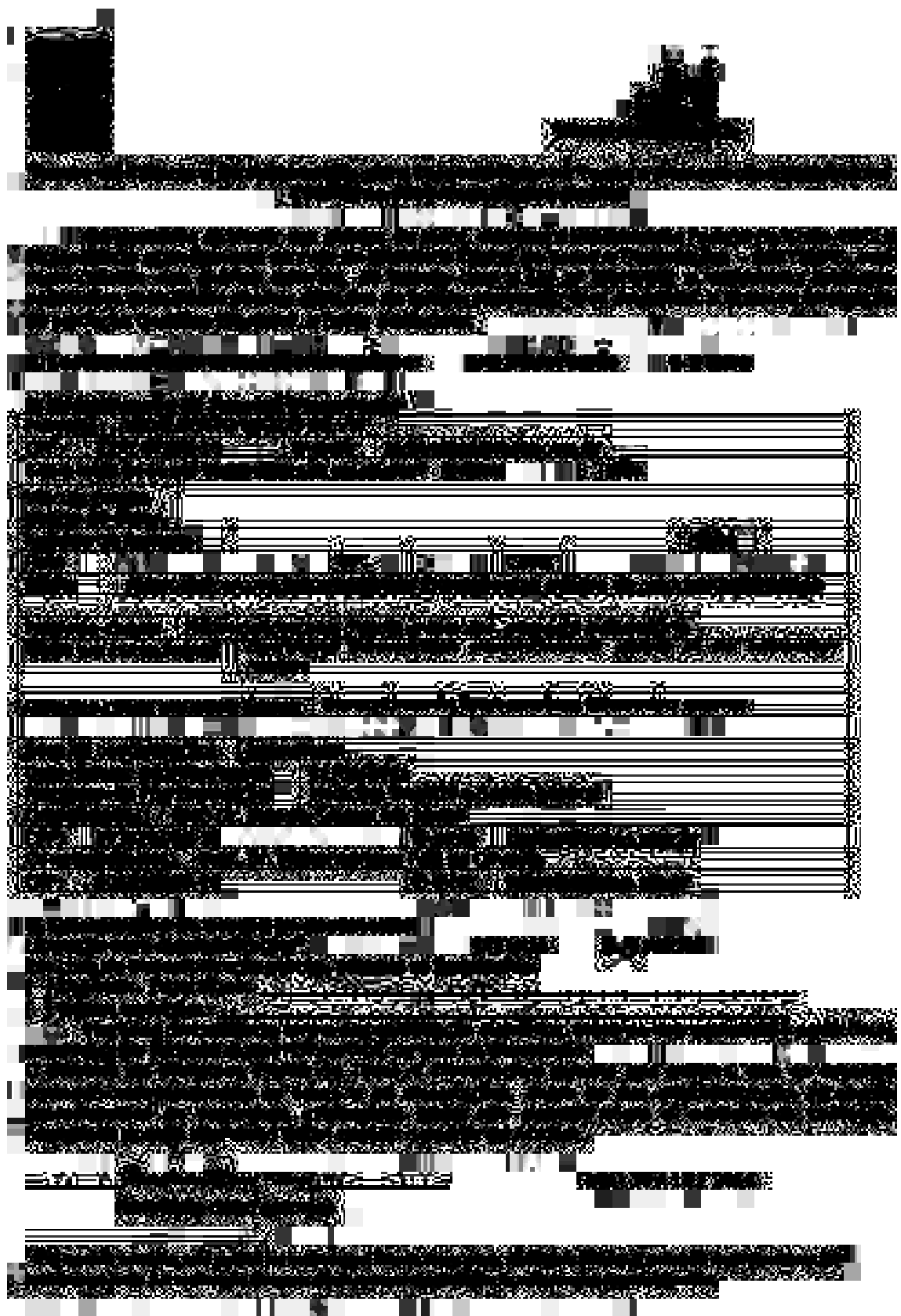


UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA

HIDELBERTO MATOS SILVA

NEUROCISTICERCOSE INTRAVENTRICULAR EXPERIMENTAL:
ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

GOIÂNIA, 2011.



HIDELBERTO MATOS SILVA

**NEUROCISTICERCOSE INTRAVENTRICULAR EXPERIMENTAL: ANÁLISE DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

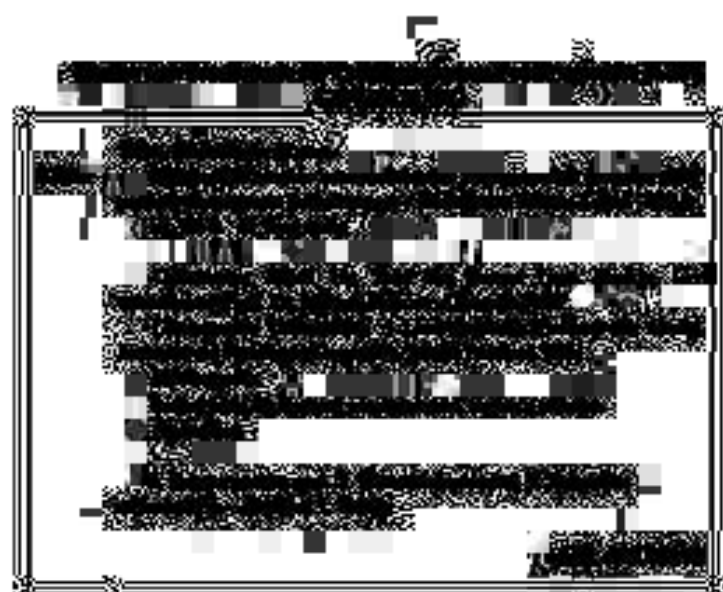
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública, área de concentração em Imunologia.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.

Este trabalho recebeu auxílio financeiro do CNPq.

GOIÂNIA, 2011.



“Não temo o que há por vir, pois venha de onde vier, nunca será maior que minha alma”
(Fernando Pessoa).

AGRADECIMENTOS

Aquela que sempre amou e protegeu os mais necessitados, cobrindo seus filhos com o seu poderoso manto azul sagrado, que derrotou o pecado e intercede por todos nós. Maria de todas as graças, Mãe de Deus, minha gloriosa Nossa Senhora Aparecida. Obrigado minha mãe santíssima, por me cobrir com o teu manto sagrado e me conduzir à vitória.

Aos meus queridos, amigos e amados pais, Neto e Vilma, por sempre terem feito de um tudo para que eu me tornasse uma pessoa feliz, honesta e batalhadora. Por sempre acreditarem e apoiarem os meus sonhos e projetos. Minha querida irmã, Nívia, meu cunhado Guglielmo e meu amado sobrinho Antônio, que mesmo longe sempre torceram e me apoiaram, essa conquista também é de vocês! Família querida, amo muito vocês.

A minha vida, companheira, amiga, amante, eterna namorada e esposa, Daniela. Obrigado por tudo que você sempre fez e faz por mim, por cada segundo de pleno amor e felicidade que você traz para minha vida. Pelo maior presente de todos, nossa amada filha Maria Clara, que nasceu junto com esse sonho chamado mestrado, inundando nossa vida de amor e felicidade. Te amo meu amor. Agradecer aos seus queridos pais, Protilde e Anita, pelo carinho, companherismo e atenção, e por participaram direta ou indiretamente desse projeto. Obrigado pelos vários “caminhões de paciência” gastos comigo nesse período.

Aos grandes amigos e companheiros do Projeto Neurocisticercose André Luiz e Bruno Pereira, sem vocês “irmãozins” esse projeto nunca seria possível. Obrigado pelas várias horas de trabalho e diversão em que passamos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental, em especial as colegas Vânia Beatriz e Aline Freitas. Obrigado por tudo.

Um agradecimento em especial aos diretores do Laboratório Santa Inês/Lapaci, Maria Helena Rebelo e Elias Cury Jr, pela imensa ajuda, compreensão e confiança.

Ao meu grande orientador Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Jr, por abrir as portas para a concretização desse grande sonho. Por ter se tornado um mentor, companheiro e amigo. Por me ajudar a me tornar um profissional e pesquisador melhor a cada dia, por seus conselhos profissionais e pessoais que mudaram a minha vida. Jamais poderei agradecer por tudo o que você fez por mim, muito obrigado. Um agradecimento especial, à Prof^a. Dr^a. Marina Clare Vinaud, pela atenção e por sua prontidão.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Milton Adriano pela colaboração.

Ao Dr. Élbio Cândido de Paula, pela participação neste projeto, por suas preciosas observações, opiniões e grande ajuda que tornou esse projeto possível. E obrigado à todos os funcionários do Laboratório CAPC, em especial ao colaborador Pedro.

Aos professores que conheci e passei a admirar durante a minha vida acadêmica e na pós-graduação. Em especial à Profa. Dra. Irmtraut Araci, por ajudar a lapidar a minha formação profissional, pelo companheirismo e por plantar a semente da docência em minha vida.

Minha eterna gratidão as Prof^{as}. Dr^{as}. Patrícia Alo Nagib Resende Loyola e Mara Silvia Carvalhaes, pelas inúmeras vezes que me socorreram e me aconselharam, vocês duas são pessoas muito queridas e especiais para mim.

Por fim, gostaria de agradecer à todos os outros professores da pós-graduação, funcionários e colegas.

“Um guerreiro enquanto ele respira, ele luta!”(Filosofia samurai).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
1.1 O complexo Teníase/Cisticercose	3
1.2 Cisticercose	5
1.3 Epidemiologia da neurocisticercose	6
1.4 Fisiopatologia da neurocisticercose	7
1.5 Resposta imune da neurocisticercose humana	13
1.6 <i>Taenia crassiceps</i>	18
1.7 O modelo experimental da <i>Taenia crassiceps</i>	20
1.8 A resposta imune no modelo murino da neurocisticercose experimental	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. ARTIGOS	26
Artigo1: “ENCEFALITE EXPERIMENTAL PROVOCADA POR CISTICERCOS DE <i>Taenia crassiceps</i> EM CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6”	27
Artigo 2: "A AUSÊNCIA DA IL-4 DIMINUI A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS INTRACRANIALMENTE COM CISTICERCOS DE <i>Taenia crassiceps</i> "	46
Artigo 3: “IFN γ INDUZ MAIOR DESTRUIÇÃO DOS CISTICERCOS DE <i>Taenia</i> <i>crassiceps</i> INTRAVENTRICULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6.”	66
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERÊNCIAS	88
9. ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico da <i>Taenia solium</i> e <i>Taenia saginata</i>	4
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Taenia crassiceps</i>	19
Figura 3: Aspectos macroscópicos de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	20
Figura 4: Mesoscopia do encéfalo de camundongos BALB/c e C57BL/6.	43
Figura 5: Mesoscopia do encéfalo de camundongo BALB/c aos 60 dias após infecção.....	43
Figura 6: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c e C57BL/6, aos 7,30, 60 e 90 dias após infecção	45
Figura 7: Mesoscopia do encéfalo de camundongo BALB/c convencional desprovido do gene de IL-4.	61
Figura 8: Fotomicrografia do encéfalo de camundongo BALB/c convencional e IL4-KO, aos 7 e 30 dias após infecção.....	62
Figura 9: Fotomicrografia do encéfalo de camundongo BALB/c convencional e IL4-KO, aos 60 e 90 dias após infecção.....	63
Figura 10: Mesoscopia de encéfalo de camundongo C57BL/6 desprovido do gene de IFN γ aos 60 dias após infecção	80
Figura 11: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene para IFN γ , aos 7 e 30 dias após infecção.....	81
Figura 12: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos C57BL/6 convencionais desprovidos do gene para IFN γ ,aos 60 e 90 dias após infecção.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reação inflamatória nos parasitos encontrados em camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	40
Tabela 2: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro em camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	41
Tabela 3: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro de camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	42
Tabela 4: Processos patológicos encontrados nos parasitos em camundongos BALB/c convencionais e desprovidos do gene da IL-4 submetidos à infecção experimental por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	63
Tabela 5: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro em camundongos BALB/c convencionais desprovidos do gene para IL-4 e submetidos à infecção experimental por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	64
Tabela 6: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro em camundongos BALB/c convencionais desprovidos do gene para IL-4 submetidos à infecção experimental por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	65
Tabela 7: Processos patológicos encontrados no parasito de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	82
Tabela 8: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	83
Tabela 9: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro em camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	84

SIGLAS E ABREVIATURAS

% - porcentagem

µm –micrômetro

a.C – antes de Cristo

APC – Célula apresentadora de antígeno

AVC – Acidente vascular cerebral

CDC – do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

CEEa/CEP –Comitê de Ética na Experimentação Animal/Comitê de Ética em Pesquisa

cm – centímetro

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAI – dias após infecção

et al. – *et alia*, entre outros

EGN – Etapa granular-nodular

ENC –Etapa nodular calcificada

EV – Etapa vesicular

EVC –Etapa vesicular coloidal

g – grama

HE – Hematoxilina-Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

IFN γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G subtipo 1

IgG2a – Imunoglobulina G subtipo 2a

IgG2b – Imunoglobulina G subtipo 2b

IgE – Imunoglobulina E

IgM –Imunoglobulina M

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4

IL-5 – Interleucina-5

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12
IL-13 – Interleucina-13
IL-15 – Interleucina-15
IL-18 – Interleucina-18
IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
KO – do inglês, *Knockout*
LCR – Líquido cefalorraquidiano
mg – miligrama
MHC-II – Complexo de Histocompatibilidade Principal II
ml – mililitro
mm – milímetro
MMWR – do inglês, *Morbidity and Mortality Weekly Report*
NCC – Neurocisticercose
NIH – *National Institutes of Health*
NK – do inglês, *Natural killer*
NLRs – do inglês, *NOD like receptors*
NOD – do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*
NO – Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – do inglês, *original fox*
PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos
PAS –Ácido Periódico de Schiff
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
SNC – Sistema Nervoso Central
T/C –Teníase/Cisticercose
TLRs – Receptores semelhantes ao *Toll*
TGFβ – do inglês, *Transformig Growth Factor beta*
Th – T helper
TNFα – do inglês, *Transformig Growth Factor alpha*
Treg – Célula do tipo “T” reguladora
UFG –Universidade Federal de Goiás
USA – Estados Unidos da América, do inglês, *United States of America*
WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês, *World Health Organization*

RESUMO

A Neurocisticercose (NCC) causada pelo cisticerco da *Taenia solium* é a principal infecção parasitária cerebral que pode resultar em sintomas clínicos como crises convulsivas e hidrocefalia. Além de consideráveis perdas econômicas, sendo responsável por mais de 50 mil mortes anuais. Os modelos experimentais tornaram-se ótimas ferramentas para o estudo da cisticercose humana em diversos órgãos, incluindo sua forma mais grave a NCC. O parasito mais utilizado nos modelos experimentais da cisticercose é a *Taenia crassiceps*, devido ao seu rápido ciclo de desenvolvimento e similaridade antigênica com *T. solium*, sendo o modelo intraperitoneal o mais difundido. A inoculação intracranial de cisticercos de *Mesocostoides corti*, é o modelo experimental mais utilizado no estudo da NCC. Os objetivos deste trabalho foram apresentar um novo modelo experimental para o estudo da NCC utilizando cisticercos de *T. crassiceps*, inoculados intracranialmente em quatro linhagens diferentes de camundongos (BALB/c, BALB/c KO-IL-4, C57BL/6 e C57BL/6 KO-IFN γ), bem como avaliar a resposta inflamatória desses animais frente à neuroinfecção, aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI). Os animais foram pesados, anestesiados com solução de xilazina/cetamina, realizada a antissepsia e tricotomia local e em seguida realizado o orifício de trepanação para a inoculação dos cisticercos. O orifício era então fechado com massa plástica estéril, suturada a incisão e os animais eutanasiados de acordo com o dia experimental com dose subletal de anestésico para a retirada do encéfalo. O novo modelo apresentado mostrou-se útil em reproduzir a doença nos animais, resultando em lesões e alterações semelhantes às que ocorrem nos seres humanos, baixa perda de animais e sem danos significantes nos controles, facilitando o estudo da doença. Observou-se que os animais BALB/c são menos resistentes à infecção, apresentando uma tendência maior à ventriculomegalia, resposta inflamatória com predomínio de células da fase aguda e destruição tardia dos cisticercos, em relação aos animais C57BL/6. Estes, mostraram uma inflamação com uma tendência ao predomínio de células mononucleares e maior eficiência na destruição dos parasitos. Comparando a resposta inflamatória nos animais BALB/c convencionais e KO-IL-4, ficou evidenciado que a ausência da IL-4 induziu maior parasitismo, favorecendo a sobrevivência dos cisticercos, menor intensidade na resposta inflamatória, ventriculomegalia e perivascularite. Ambas as linhagens destruíram os cisticercos no final da fase tardia da inflamação. Na comparação da resposta inflamatória dos camundongos C57BL/6 convencionais e KO-IFN γ , a presença do IFN γ induziu maior ventriculomegalia, cronificação da inflamação, microgliose e destruição precoce dos cisticercos. Na ausência do IFN γ , a resposta inflamatória apresentou menor intensidade e destruição tardia dos cisticercos.

Palavras chave: *Taenia crassiceps*, neurocisticercose, resposta inflamatória.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is caused by *Taenia solium* cysticercus and is the main cerebral infection caused by a parasite which can produce seizures and hydrocephaly. Besides the considerable economic losses it is also responsible for over than 50 thousand annual deaths. The use of experimental models has become a good method to the study of human cysticercosis in several organs including the central nervous system. The most used parasite is *T. crassiceps* cysticerci due to its rapid cycle of development and the antigenic similarity to *T. solium* and its intraperitoneal model is the most diffused. The inoculation of *Mesocostoides corti* cysticerci is the most common model of NCC used. Objectives: present a new experimental model to NCC studies by using *T. crassiceps* cysticerci inoculated into four different mice lineages (BALB/c, BALB/c KO-IL-4, C57BL/6 e C57BL/6 KO-IFN γ) and evaluate the inflammatory response of these animals to the infection during 7, 30, 60 and 90 days after the infection (DAI). This new model showed itself useful into reproducing the disease in animals resulting into lesions and alterations similar to the ones found in humans and without significant damages in the control groups, which enables the study. We observed that BALB/c mice are the less resistant to the infection, presenting greater ventriculomegaly, inflammatory response with the prevalence of acute phase cells and late destruction of the cysticerci when compared to C57BL/6 mice. The latter showed inflammation with prevalence of mononuclear cells and greater efficiency in the destruction of the parasites. When comparing the inflammatory response of conventional BALB/c mice to KO-IL-4 ones it was possible to observe that the absence of IL-4 induces greater parasitism which favors the cysticerci survival, less intensity of the inflammatory response, ventriculomegaly and perivascularitis. Both lineages destroyed the cysticerci at the end of the late phase of the inflammation process. When comparing the inflammatory response of conventional C57BL/6 mice to KO-IFN γ ones, the presence of IFN γ induced greater ventriculomegaly, chronification of the inflammation, microgliosis and precocious destruction of the cysticerci. In the absence of IFN γ the inflammatory response showed less intensity and late destruction of the cysticerci.

Key words: *Taenia crassiceps*, neurocysticercosis, inflammatory response.

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose é uma morbidade conhecida desde a antigüidade, entretanto, o ciclo biológico dessa helmintose ficou incerto até a segunda metade do século XIX, quando pesquisadores alemães demonstraram que a forma larvária de *Taenia solium* era responsável pelo desenvolvimento da doença em animais e humanos (Nieto 1982). Acreditava-se que a fase larvária de *Taenia solium* era uma espécie distinta e por isso recebeu o nome *Cysticercus cellulosae* por Rudolphi em 1809. O nome *Cysticercus* proposto por Linnaeus é derivado de palavras gregas *kustis* (cisto, vesícula) e *kercos* (cauda). O termo *cellulosae* foi proposto por Rudolphi em 1809, baseado na freqüente localização do cisticerco na região subcutânea (Nieto 1982; Pitella et al. 1997).

A doença foi descrita pela primeira vez em suínos pelo pensador grego Aristóteles. A partir de então, gerou-se um conceito equivocado que considerava o porco como transmissor da morbidade, o que serviu de base para o repúdio ao consumo de carne suína por grande parte dos povos antigos. Exemplo deste fato pôde ser constatado em 300 a.C., época em que primeiros escritos judeus já proibiam o consumo desse tipo de carne, sob pena de prisão. Na era da medicina moderna, o primeiro caso de cisticercose humana foi descrito no século XVI, sem que se conhecessem o agente etiológico ou o ciclo biológico da doença. Fato esclarecido pela descrição realizada em meados do século XIX (Nieto 1982).

Assim, durante quase dois milênios, desde a descrição da doença por Aristóteles, a cisticercose assombrou a humanidade, posteriormente, pôde-se entender melhor o ciclo da doença, indicando que a cisticercose é transmitida pelo homem e não pelos animais infectados, como se pensava. Contudo, a influência social e cultural desse mal entendido, que perdura por séculos, ainda permeia a sociedade, principalmente nos países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, onde o baixo acesso à informação, além de contribuir para a perpetuação deste conceito, contribui para a disseminação da cisticercose. A proliferação de doenças de importância em saúde pública está, geralmente, associada às más condições socioeconômicas dos países em desenvolvimento (Agapejev et al., 2007; Terrazas 2010). Machado et al. (1988), descreveram que a cisticercose humana apresentava uma distribuição mundial, sendo encontrada em todos os continentes, inclusive na América Latina. Constatando que a endemicidade da enfermidade está, nitidamente, associada à falhas no saneamento básico e fiscalização sanitária, hábitos de consumo de carne crua ou mal cozida, falta de água potável, desconhecimento da população sobre a doença, contaminação do meio

ambiente, irrigação de hortaliças com água contaminada e venda de carne com cisticerco (Flisser 1991; Agapejev et al., 2007; Flisser 2010).

1.1 O complexo Teníase/Cisticercose

O complexo teníase-cisticercose (T/C) engloba duas morbidades distintas, com sintomatologia e epidemiologia totalmente diferentes. A teníase e a cisticercose respectivamente são afecções produzidas pelas fases adultas e larvárias dos helmintos da família *Taenidae*. As duas principais espécies que afetam os seres humanos são *Taenia solium* e *Taenia saginata*, que necessitam de hospedeiros intermediários para completarem seus ciclos de vida. O homem é o hospedeiro definitivo para o estágio adulto de ambas as espécies de *Taenia*, enquanto que suínos e bovinos são os hospedeiros intermediários para os estágios larvários desse parasito (Del Brutto & Sotelo 1988; Flisser 1991). Essas duas doenças são importantes zoonoses que não possuem programas públicos de saúde específicos (Agapejev 2003). Os mecanismos de infecção pelos quais o homem pode adquirir a cisticercose são: 1) Auto-infecção interna que ocorre quando o portador de tênia vomita através dos movimentos retroperistálticos do intestino, assim os ovos sofrem a ação do suco gástrico e ocorre a ativação dos embriões, que penetram pela mucosa intestinal, atingindo os vasos sanguíneos e se alojando em diversos locais do organismo, como o sistema nervoso central (SNC), coração e músculos; 2) Auto-infecção externa, por contaminação fecal-oral de mãos e alimentos com ovos provenientes de sua própria *Taenia* e 3) Hetero-infecção, a maneira mais comum, na qual o homem ingere água, hortaliças e/ou frutos contaminados com ovos (Figura 1) (Pessoa & Martins 1982).

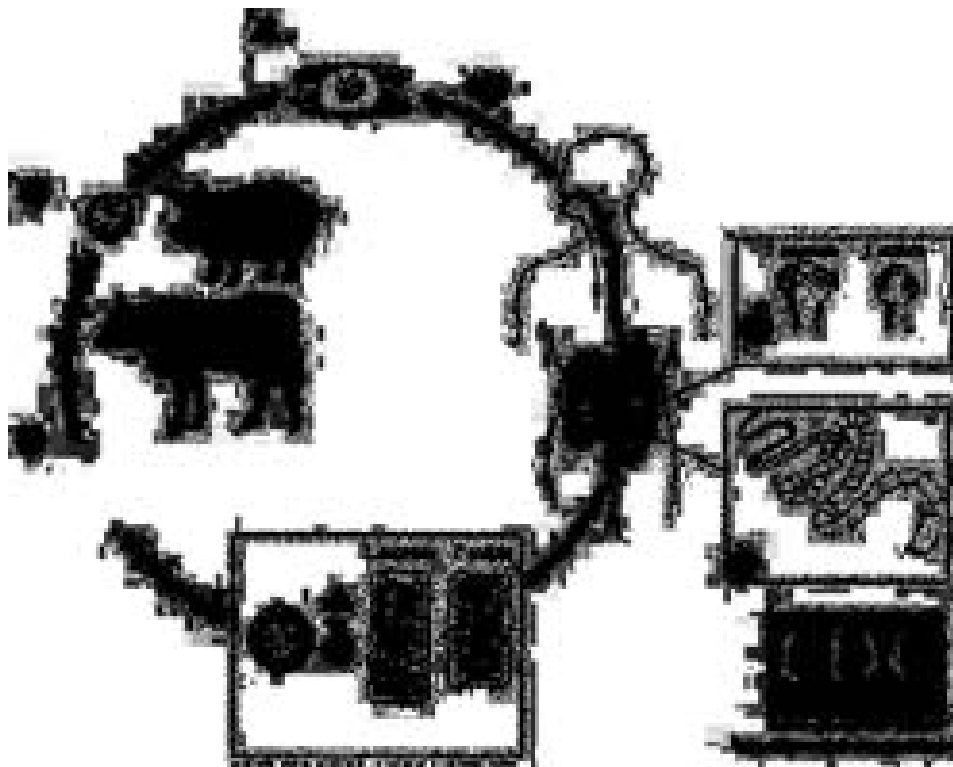


Figura 1: Ciclo biológico da *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Fonte: www.dpd.cdc.gov

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

1.2 Cisticercose

A cisticercose é a afecção com maior gravidade para o ser humano, cujas manifestações clínicas não dependem somente da localização, como também do número de parasitos, estágio de desenvolvimento do cisticerco e das características orgânicas do hospedeiro. As manifestações clínicas de maior importância ocorrem quando o parasito se aloja no SNC causando a neurocisticercose (NCC) que se destaca por sua extensa diversidade clínica e pela gravidade dos sintomas (Pitella 1997). O homem neste caso é considerado hospedeiro intermediário, sendo infectado somente pela forma larvária (*Cysticercus cellulosae*) de *Taenia solium*. (Del Brutto & Sotelo 1988; Flisser 1991). Ao atingir os tecidos através da circulação sangüínea e linfática o cisticerco desenvolve-se em aproximadamente dois meses, mais freqüentemente, no SNC (Del Brutto & Sotelo 1988), músculo esquelético, olhos, pele e coração (Lino-Jr et al., 2002; Flisser 1991).

1.3 Epidemiologia da Neurocisticercose

A Neurocisticercose (NCC) é a forma mais freqüente da cisticercose, uma doença considerada como um marcador biológico do desenvolvimento social e econômico de uma comunidade (Prasad et al., 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a NCC é responsável por 50.000 óbitos anuais em países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, principalmente da Ásia, África e América Latina (WHO 2010).

A NCC é identificada como a principal causa de epilepsia ativa em 26,3% dos 53,8% dos pacientes em clínicas neurológicas de países em desenvolvimento, incluindo a América Latina (Del Brutto et al. 2005). A afecção é responsável por até 2% das admissões neurológicas e neurocirúrgicas no Sul da Califórnia e mais de 100 casos anuais nos Estados Unidos (Prasad et al. 2008). Schenone et al.(1982) relataram a existência da NCC em 18 países da América Latina, com uma estimativa de 350 mil pacientes.

A freqüência desta enfermidade no Brasil, em autópsias, varia de 0,12 a 9%, na clínica de 0,03 a 13,5%, e nos estudos soropidemiológicos de 0,68 a 6,2%. As áreas endêmicas estão compreendidas nos estados da região central do Brasil além de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo. O gênero masculino é o mais atingido e a procedência é em maior parte oriundos da zona rural. O quadro clínico preponderante é a epilepsia seguida de cefaléia e hipertensão intracraniana (Agapejev 2003). Em estudo com pacientes internados no Hospital das Clínicas de São Paulo, capital, Machado et al. (1988), observaram incidência de 0,2% de cisticercose, tanto no período de 1969 a 1978, quanto entre 1979 e 1985.

A maioria dos indivíduos infectados está na faixa etária entre 20 e 50 anos de idade, o impacto socioeconômico da NCC é variado, com sofrimento individual e da sociedade. Em termos numéricos, a cisticercose acarreta perdas anuais superiores a 3 ou 4 bilhões de dólares em atendimentos médicos e intervenções cirúrgicas, além de, medidas de controle e prejuízos na produção animal (Hoberg 2002). A gravidade da doença pode ser ajuizada pela sua letalidade que varia de 16,4% a 25,9% (Takayanagui & Leite, 2001).

1.4 Fisiopatologia da Neurocisticercose

Em decorrência da grande variabilidade dos aspectos anatomopatológicos que a NCC pode assumir, é possível agrupar algumas formas anatomoclínicas básicas que refletem a forma do cisticerco presente, o estado de viabilidade da larva, sua localização e número, além do grau de reatividade imunológica do hospedeiro. As consequências sobre o SNC e seus envoltórios dependem da combinação desses elementos, resultando em processos inflamatórios, compressivos e obstrutivos, que podem associar-se ou não entre si. Os processos obstrutivos originam-se do bloqueio da circulação liquórica por cisticercos localizados nos ventrículos ou no espaço subaracnóideo. Mais freqüentemente, entretanto, a obstrução é induzida pelo desenvolvimento de granulações subependimárias, nos casos de NCC ventricular, e por leptomeningite crônica fibrosante, nos casos de NCC subaracnóidea. Em alguns casos pode-se observar mais de uma forma anatomoclínica ocorrendo ao mesmo tempo, recebendo o nome de forma combinada, dificultando ainda mais o diagnóstico e tratamento nesses casos (Flisser 1982).

A variabilidade da doença resulta em várias classificações baseadas em características anatômicas (parenquimal, subaracnóidea, intraventricular e espinhal ou medular); em sintomas clínicos (distúrbios mentais, síndromes localizadas, aumento da pressão intracranial e síndrome da pressão medular); pela atividade da doença avaliada por tomografia computadorizada e análise do líquido (formas ativa e inativa) e ainda de acordo com o seu prognóstico (formas benignas ou malignas) (Pittella 1997, Agapejev 2003).

No caso da NCC humana ao analisar o parasito, do ponto de vista morfológico, a interação parasito-hospedeiro é classificada em quatro etapas de desenvolvimento que são: vesicular, vesicular coloidal, granular nodular e nodular calcificada. O cisticerco é considerado viável quando está na etapa vesicular (EV), isto é, com uma membrana transparente contendo líquido e a larva invaginada em seu interior, sendo que há áreas de tegumento do parasita histologicamente intactas, e outras áreas com infiltrado inflamatório no hospedeiro e discreta gliose. Nessa primeira etapa, a resposta imune pode variar de tolerância até intensa resposta inflamatória. A próxima etapa é a vesicular coloidal (EVC), que se caracteriza por necrose da larva e a vesícula aparece mais espessa e com líquido turvo ou fracamente gelatinoso e esbranquiçado. O escólex apresenta sinais de degeneração hialina. No tegumento do parasito observam-se alterações, tais como, infiltrado inflamatório com linfócitos, neutrófilos, monócitos e células gigantes do tipo corpo estranho, além de

fibroblastos e fibras colágenas. No tecido do hospedeiro, as arteríolas vizinhas ao parasito apresentam endarterite e necrose fibrinóide na túnica média, encontrando-se, eventualmente, oclusão completa da luz vascular por proliferação endarterial ou trombo. A terceira etapa é a granular nodular (EGN), na qual a vesícula tende a reduzir seu tamanho, tornando seu conteúdo semi-sólido. Nessa etapa, visualizam-se restos do parasito, o escólex é transformado em um grânulo mineralizado e o infiltrado inflamatório é composto por células mononucleares. Na etapa final ou etapa nodular calcificada (ENC), os constituintes do parasita não são identificados, resultando em um nódulo sólido, mineralizado, rodeado totalmente por tecido conjuntivo denso não modelado (Pittella 1997; Lino-Jr et al., 2002).

Analisando microscopicamente as lesões causadas pela cisticercose no SNC, observa-se uma variação das lesões de acordo com a viabilidade dos parasitos. Quando viáveis, praticamente não induzem reação inflamatória apresentando alguns fibroblastos ou condensação do tecido nervoso central com discreta gliose. Por outro lado, quando o parasito morre, observam-se várias características da reação inflamatória: têm-se um infiltrado pleomórfico com neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas, histiócitos e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, além de fibroblastos e fibras colágenas em graus variáveis, de acordo com a gravidade da inflamação e o tempo de morte do parasito. O exsudato inflamatório apresenta maior intensidade na região em que se encontram os restos do parasito morto, a confluência da reação inflamatória e fibrose ocorrem principalmente nas áreas de meningite basal crônica. Pode-se encontrar gliose e um amolecimento das lesões parenquimatosas cerebrais, variáveis segundo o estágio e a viabilidade dos parasitos (Márquez-Monter 1972; Pittella 1997).

Os diferentes tipos de lesões em qualquer parte do corpo humano produzidas pela infecção por cisticercose dependem fundamentalmente do tempo transcorrido após a infecção, a qual está principalmente relacionada com a viabilidade do parasito, com a carga parasitária, com a localização e finalmente o estágio do cisticerco, assim como a possibilidade de uma reação imune-inflamatória quando se destrói o mesmo (Márquez-Monter 1972; White Jr 2000).

Ao penetrar por via hematogênica o embrião hexacanto pode alojar-se nos tecidos ou cavidade do SNC, recebendo o nome de neurocisticerco. Analisando macroscopicamente encéfalos infectados com cisticercos, distingue-se quatro formas principais de NCC: 1) forma meníngea; 2) forma ventricular; 3) forma parenquimatosa e 4) formas mistas (Garg et al.,

2008). De acordo com Del Brutto e Sotelo (1988), as formas meníngeas e ventriculares são as predominantes.

No SNC os cisticercos podem ser encontrados nas fossas anteriores, média ou posterior, dentro e fora do parênquima, podendo também, em raras situações, serem localizados no canal raquidiano. Na fase inicial de todas as formas de infestação, os parasitos são pequenos e sólidos; entretanto, rapidamente se desenvolvem para a forma cística. Aproximadamente metade dos casos que se examinam nas autópsias mostram um ou dois cisticercos, os quais, dependendo de sua localização, poderão ou não ter cursado com sintomas (Márquez-Monter 1972).

As infestações múltiplas habitualmente comprometem o sistema circulatório do líquido cefalorraquidiano (LCR); por outro lado, somente um cisticerco do tipo racemoso fixado no quarto ventrículo, pode produzir sintomas de hipertensão intracranial. A duramáter habitualmente não é afetada e apresenta-se intacta; as meninges pia-aracnóides, geralmente encontram-se espessadas em sua base quando os cistos se rompem e produzem uma reação inflamatória, que se manifesta por um exsudato espesso, leitoso ou amarelado. Esta lesão tem sido considerada como meningite basal cisticercosa (Márquez-Monter 1972; Pittella 1997).

Ao exame macroscópico do cérebro, podem-se encontrar cisticercos na convexidade ou na base, em secções coronais no parênquima e nos ventrículos. Habitualmente os cisticercos da convexidade se encontram incrustados no córtex cerebral e parcialmente oculto nas circunvoluções, raras vezes livres. As vesículas parenquimatosas são encontradas mais comumente na substância cinzenta que na substância branca, o que pode-se explicar com base na circulação cerebral. Os diferentes graus de maturação do parasito podem ser vistos, quando se observam as formas imaturas que alcançam de 2 a 3 cm de diâmetro junto com os cistos, alguns dos quais chegam a alcançar mais de 10cm de diâmetro. Uma explicação para a variabilidade dos cistos poderia ser devido às diferentes capacidades de maturação do parasito ou as propriedades nutricionais do lugar no qual se implantam podem influir na variação da forma dos mesmos (Márquez-Monter 1972; Flisser et al. 1982).

O espessamento inflamatório das meninges (meningite) produzem uma aracnoidite aderente o que habitualmente bloqueia a circulação do líquido no espaço subaracnóideo, resultando em um tipo de hidrocefalia comunicante. Também ocorrem em casos que o cisticerco pode alojar-se no aqueduto de Silvius ou no quarto ventrículo, produzindo um tipo de hidrocefalia não comunicante. O grau de dilatação ventricular depende principalmente da gravidade e duração da obstrução (Agapejev et al. 2007). As formas meníngeas apresentam

reação inflamatória e fibrose quando os parasitos viáveis se alojam nas leptomeninges da convexidade ou na base do cérebro. Quando ocorre a morte, existe considerável inflamação manifestada essencialmente por neutrófilos, com posterior aparecimento de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho ao redor da membrana do parasito e raras vezes encontram-se eosinófilos no infiltrado inflamatório (Pittella 1997). Numerosas arteríolas na região próxima ao parasito apresentam endarterite característica e em outras ocasiões observa-se necrose fibrinóide na túnica média. Nos casos de oclusão completa da luz vascular por proliferação endoarterial ou obstrução produzida por trombos, o parasito necrosado ou seus restos podem ser identificados no exsudato inflamatório e habitualmente estão rodeados por células gigantes multinucleadas. O exsudato inflamatório pode estender-se ao córtex subjacente no qual encontram-se o infiltrado linfocítico perivascular e modificações nos neurônios e células gliais. Esta forma representa a variedade meningoencefálica da cisticercose. Quando existe um extenso exsudato inflamatório na base do cérebro em conjunto com o aspecto macroscópico, as modificações são características de meningite cisticercosa. Nesta condição, além da reação do tipo inflamatória descrita, pode-se observar fibrose, granulomas de corpo estranho e reação inflamatória discreta constituída por linfócitos (Márquez-Monter 1972; Garg et al., 2008).

Em algumas ocasiões os cistos aderem-se entre si formando conglomerados ou uma grande vesícula lobulada de paredes delgadas, translúcidas e sem escólex em seu interior, recebendo o nome de cisticerco racemoso. A forma racemosa é observada com maior frequência associada com a meningite cisticercóide. Possivelmente resultado de episódios irritativos recorrentes nas meninges em reação ao parasito, ocasionando uma meningite proliferativa e por razões puramente físicas, devido ao constante movimento do LCR, principalmente nos ventrículos laterais, o cisticerco aderido nessa região se estende na direção do fluxo do líquido. A possibilidade de que este tipo de cisticerco perca suas estruturas parasitárias internas e adquira seu aspecto macroscópico típico, dando origem a uma variedade racemosa, parece ser devido à sua localização. Corroborando com esta afirmação, tem-se que praticamente todos os cisticercos que se encontram nas cavidades ventriculares ou espaços subaracnóides (Márquez-Monter 1972; Pittella 1997). As vesículas grandes podem produzir um quadro de lesão do tipo ocupativo, com expansão do SNC circundante no cérebro, cerebelo ou raras vezes na medula espinhal.

Quando existem poucos cisticercos no parênquima, com frequência os parasitos morrem e calcificam (Del Brutto et al. 2001). A forma mais comum da enfermidade é

observada principalmente em crianças. Nelas o quadro macroscópico descreve a presença de numerosos orifícios, que representam uma invasão maciça de parasitos pequenos que não conseguem chegar a um estado adulto de desenvolvimento (Márquez-Monter 1972).

Na forma parenquimatosa, a presença das formas imaturas no parênquima cerebral, talo, cerebelo e medula, produzem infiltração por linfócitos, com ou sem gliose e compressão do tecido nervoso. Por outro lado, os parasitos mortos produzem uma reação inflamatória similar a que se descreve na forma meníngea, embora raras vezes cheguem a ser confluentes ou produzirem uma liquefação do tecido cerebral. Os parasitos calcificados freqüentemente estão rodeados por uma fina camada de tecido fibroso e gliose. Sua presença em uma zona ativa do cérebro pode originar sinais de focalização assim como convulsões e outras manifestações clínicas; por outro lado, podem permanecer silenciosos sem produzir sintomas (Del Brutto et al. 2001; Márquez-Monter 1972; White Jr 2000).

Na forma ventricular os parasitos podem ser simples ou múltiplos, imaturos ou adultos, livres no LCR ou aderidos na camada endimial dos ventrículos. Ao se aderirem os cisticercos adquirem uma forma pendiculada, muitas vezes atuando como uma válvula tamponando os ductos dos ventrículos. A *ependimitis granularis* consiste em uma reação inespecífica com proliferação celular na superfície dos ventrículos, que recebe o nome de endimite (Agapejev et al. 2007). Raras vezes os parasitos produzem uma reação inflamatória grave, embora possamos encontrar endimite. Essas granulações distribuem-se regularmente formando áreas com a aparência de pequenas gotas de água, cada granulação apresenta-se bem limitada e translúcida, nas quais observam-se na superfície endimária áreas bem conservadas e áreas granulares com interrupção do epitélio cuboidal do epêndima com discreta proliferação vascular, edema, infiltração linfocitária e gliose do tecido nervoso subjacente (Agapejev et al. 2007). Nos pontos de inserção dos cisticercos no sistema ventricular pode-se observar infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e um grau variável de gliose com ruptura da cobertura endimária. O hospedeiro forma uma cápsula reativa fibrosa externa ao cisto, o qual é composto por fibras colágenas e com distribuição irregular, células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, assim como focos de linfócitos, neutrófilos e histiócitos (Márquez-Monter 1972).

Na complicação intraventricular cerebral da NCC, a hidrocefalia, observa-se uma meningite basal cisticercosa produzida por um mecanismo similar ao que se observa na meningite tuberculosa com o bloqueio da absorção do líquido na região do espaço subaracnóideo que é realizada pelas vilosidades aracnóideas presentes nos sinos venosos,

produzindo um tipo de hidrocefalia comunicante. Não é rara a localização de um cisticerco no sistema ventricular que atue como uma válvula, produzindo uma obstrução do aqueduto de Silvio ou do quarto ventrículo; esta última complicação habitualmente é produzida pela forma racemosa do parasito. A forma mais freqüente de hidrocefalia é a que se observa associada com a meningite basal cisticercosa. A hidrocefalia crônica tratada cirurgicamente, com freqüência se complica com meningite purulenta e ependimite. Pode ainda ocorrer crescimento assimétrico dos ventrículos, quando existe pressão interna nos mesmos, produzida pela presença dos parasitos (Márquez-Monter 1972; Gasparetto et al. 2008).

1.5 Resposta imune da Neurocisticercose Humana

Em muitas doenças infecciosas ocorre um aumento evidente da resposta imune inflamatória do hospedeiro direcionada ao patógeno podendo resultar em benefícios ou prejuízos ao tecido adjacente do hospedeiro. A resposta imune inflamatória pode ser ambígua em termos de mecanismos fisiológicos, nos quais a destruição do parasito, muitas vezes, implica em lesão tecidual do hospedeiro provocando inflamação, necrose e fibrose. Este pode ser o caso da NCC, onde a resposta imune pode levar a destruição do cisticerco, além de promover lesões inflamatórias nos tecidos próximos quando efetores imunes se ligam aos antígenos do parasito. Embora, uma forte resposta imune no hospedeiro possa proteger de muitas formas graves de infecção, em outras, elas podem resultar em reações inflamatórias cerebrais com consequências clínicas graves (Del Brutto et al., 2001; Sciutto et al., 2007).

A identificação dos principais cenários orgânicos onde ações e mecanismos da resposta imune interagem com o parasito para induzir proteção e/ou lesão, podem servir para desenvolver estratégias eficientes e seguras para a prevenção e tratamento da NCC (Sciutto et al., 2007).

Quando um patógeno entra em um organismo imunocompetente, a resposta imunológica inata e adaptativa é desencadeada pelo hospedeiro, podendo culminar na destruição do patógeno e/ou de tecidos do hospedeiro. O SNC possui um conjunto de mecanismos que trabalham para manter sua condição imunoprivilegiada sob circunstâncias normais, porém, podem desenvolver resposta inflamatória durante infecções e lesões. Durante infecções, vários mecanismos agem juntos induzindo a produção de mediadores inflamatórios como quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas (Chavarria et al. 2003), que culminam na infiltração de leucócitos e o desenvolvimento de resposta imune adaptativa patógeno específica (Ransohoff et al. 2003). Um dos principais mecanismos envolvidos neste processo ocorre pelo reconhecimento direto dos microrganismos pelas células do tecido nervoso, como as micróglia, com subsequente geração de condições inflamatórias importantes na iniciação da resposta imune no SNC (Alvarez et al. 2010). Estudo recente demonstrou que o sistema imune inato do hospedeiro possui um importante papel no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que constituem uma família de moléculas microbianas (Kumar et al. 2009). Os PAMPs por sua vez, são reconhecidos pela família dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) expressos pelas células do hospedeiro como os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs) e NOD (NLRs) (Akira

et al. 2006). No caso dos TLRs, eles detectam PAMPs de uma ampla gama de patógenos como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Uma vez que os PAMPs foram reconhecidos pelos TLRs, a ativação desses receptores induz a produção e liberação de óxido nítrico (NO) que podem matar diretamente os patógenos, além de induzir a produção de mediadores proinflamatórios que levam ao recrutamento de células imunológicas e instalação de uma resposta imune adaptativa (Alvarez et al. 2010). Treze TLRs já foram identificados em mamíferos (Beutler et al. 2004), sendo que alguns foram encontrados expressos em células do SNC e leucócitos infiltrados em modelos experimentais (Alvarez et al. 2010).

A eficácia protetora ou patogênica da resposta imune inata depende muito da geração de uma inflamação não-específica local ao redor do parasito, enquanto que a resposta imune adaptativa apóia-se em uma proliferação clonal seletiva de células linfóides e da posterior diferenciação para células efectoras do tipo Th1, Th2 e outros tipos, além de células reguladoras, com subsequente produção de várias citocinas e ativação de células plasmáticas resultando na produção de anticorpos específicos (White Jr et al. 2000; Sciutto et al. 2007).

Na NCC humana, a grande diversidade das formas clínicas sugere que a origem dessa multiplicidade envolva a complexa participação de diversos fatores do sistema imunológico (Flisser et al. 1991; Sciutto et al. 2007).

Os tipos celulares associados com a inflamação no SNC são todas as células envolvidas com a resposta inflamatória como linfócitos T e B, células reguladoras, plasmócitos, macrófagos, células epitelióides, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Em relação às citocinas, observa-se a presença de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6 e IL-18), citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-13), citocinas antiinflamatórias (IL-10 e TGF- β). Pode-se observar também um aumento na expressão de moléculas associadas com a apresentação de antígenos e moléculas de adesão (Rodriguez-Sosa et al. 2004; Sciutto et al. 2007).

Estudos com amostras de líquido em pacientes com NCC sintomática, detectaram níveis aumentados de citocinas inflamatórias (Chavarria et al. 2005), junto com as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF α , nos casos onde os cisticercos localizavam-se no espaço subaracnóideo. Também foram detectados altos níveis de IL-10, uma citocina imunodepressora produzida inicialmente por células Th1 e por T reguladoras (Treg) que possivelmente participam na regulação da inflamação na NCC, minimizando os danos ao tecido do hospedeiro (Chavarria et al. 2005; Belkaid 2007).

As lesões no SNC, como nos acidentes vasculares cerebrais (AVCs), induzem uma imunodepressão sistêmica, que é caracterizada por uma modificação para um padrão de

citocinas do tipo Th2 que resultam no aumento da neuroproteção e regeneração (Terrazas 2008).

Estudando as células mononucleares no sangue periférico de pacientes com NCC ativa, Bueno et al. (2004) observaram que essas células produziam principalmente IL-4, IL-12 e TNF α , enquanto que nos casos de NCC inativa, essas células produziam IL-6, IL-10, IL-12 e TNF α .

O estudo da resposta imune na NCC humana tem permitido esboçar padrões de resposta em indivíduos que tiveram contato com o parasito. Pode-se observar diferenças nos padrões de resposta imune em indivíduos que vivem em áreas não endêmicas com aqueles que moram em comunidades rurais altamente endêmicas, estes possuem altos níveis de proliferação de linfócitos antígeno-específico e níveis de anticorpos IgG, além de um perfil misto de citocinas do tipo Th1/Th2, caracterizado pela produção de TNF α e IL-10 após a estimulação antígeno-específico de células linfóides mononucleares periféricas, resultando em uma resposta final reguladora (Sciutto et al. 2007).

A resposta inflamatória desencadeada pelo cisticerco no SNC pode levar ao aumento local de células inflamatórias que chegam através das principais rotas de infiltração leucocitária (vasos parenquimais, vasos do espaço subaracnóideo e plexo coróide) (Ransohoff et al. 2003), além de citocinas e peptídeos que regulam múltiplas funções e normalmente desencadeiam interações imprevisíveis, como a produção de citocinas próinflamatórias como IFN- γ , IL-18 e IL-6. A IL-6 é uma das principais citocinas associadas à inflamação no SNC e exerce um papel fundamental na regulação geral de neurônios, astrócitos e micróglia. Níveis elevados dessas citocinas têm sido descritos em diferentes doenças infecciosas (Sciutto et al. 2007). A IL-6 foi descrita originalmente como sendo uma citocina indutora de resposta imune e inflamatória, além de ser produzida por linfócitos que estimulavam a fase final de maturação dos linfócitos B em plasmócitos. Ela está relacionada com diversos processos como hematopoese, respostas de fase aguda, remodelamento ósseo e processos metabólicos. No SNC a IL-6 pode iniciar a resposta celular mediando inflamação, neurogênese, gliogênese, crescimento e sobrevivência celular, mielinização e desmielinização, apesar de ser normalmente expressa em baixas concentrações. (Wei et al. 2011; Spooren et al. 2011). Interleucina 6 exerce um papel fundamental na neuroinflamação, que resulta na ativação das células imunes residentes, conhecidas como micróglia e astrócitos. Uma vez ativadas sofrem proliferação e hipertrofia, produzindo inúmeros mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, resultando em astrogliose e microgliose (Spooren et al. 2011). Seu possível papel neuroprotetor pode contribuir na prevenção de efeitos indesejáveis da resposta inflamatória, além de participar na modulação imune no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (Sciutto et al. 2007).

Enquanto que a IL-5 pode induzir infiltração e ativação de eosinófilos no SNC, podem induzir a liberação de mediadores inflamatórios retornando o estado da doença para uma fase

inflamatória. A produção dessas citocinas no SNC pode ser importante na indução e ativação de uma resposta imune do tipo Th1, embora direcionada para a destruição do parasito, o processo inflamatório desencadeado pode causar danos ao cérebro do hospedeiro, provocando disfunção sináptica e morte neuronal (Rodriguez-Sosa et al. 2004; Sciutto et al. 2007).

A habilidade da IL-10 em regular a produção de mediadores imunes pelas micróglia e assim, diminuir a resposta próinflamatória induzida pelo parasito pode resultar em uma resposta inflamatória sem danos ao SNC. Seu efeito sobre as células gliais residentes pode limitar as lesões inflamatórias em resposta ao cisticerco e pode induzir uma redução na inflamação em regiões próximas aos parasitos, principalmente aqueles localizados no parênquima como observado em muitos casos de NCC em humanos (Sciutto et al. 2007; Terrazas et al. 2008).

A resposta inflamatória em humanos depende do estágio evolutivo do parasito e da resposta imune celular. Estudos recentes têm demonstrado em humanos que macrófagos próximos ao parasito apresentam baixa expressão de moléculas MHC-II, enquanto que células mais distantes da região do parasito apresentam altos níveis de expressão da mesma molécula. Esses achados claramente sugerem que os antígenos do cisticerco podem inibir diretamente a maturação e ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs), bem como, diminuir a resposta imune antiparasitária facilitando a cronicidade da infecção. O que nos leva a acreditar na capacidade intrínseca do parasito viável e suas moléculas associadas em provocar uma inibição na atividade celular na NCC (Alvarez et al. 2008).

Já a resposta imune humoral na NCC está relacionada com a magnitude da infecção. Esse tipo de resposta é maior em pacientes com múltiplos cistos, quando comparados com infecções com cistos únicos. Várias classes de imunoglobulinas são produzidas como anticorpos específicos contra o parasito (IgG, IgM e IgE). O tipo mais frequente é a IgG, subtipo IgG2b, IgG2a e IgG1 no soro, LCR e saliva, sugerindo uma infecção crônica (Terrazas et al., 1998). Após a segunda semana de infecção há um significativo aumento na produção de IgG2a, depois este subtipo é inibido. Cistos obtidos de cérebros infectados com cisticercos demonstraram IgG, IgM, IgA e IgE do hospedeiro em sua superfície e fluido, sugerindo que os parasitos sobrevivem recobrando-se de imunoglobulinas do hospedeiro, provavelmente através de receptores para a porção Fc dos anticorpos presentes na superfície de seu tegumento, na tentativa de burlar o sistema imune do hospedeiro (Flisser 1991). A evasão imune pelo parasito pode resultar de: isolamento de antígenos glicoproteicos importantes em seu interior, ligação de alguns antígenos do hospedeiro à parede do parasito

(mimetismo molecular), aumento de células Tregs, ativação policlonal de linfócitos B, variação antigênica em casos de múltiplo parasitismo, inibição da fração C1q do sistema complemento e ligação do parasito à porção Fc dos anticorpos do hospedeiro (Pittella 1997).

A resposta imune detectada na NCC humana vai da completa ausência de resposta (assintomática) até uma severa resposta inflamatória (sintomático) (Del Brutto et al. 2005).

Em muitos casos, parasitos viáveis possuem pouca inflamação ao seu redor, condizentes com os quadros assintomáticos relatados na NCC. Em contraste, a grande maioria dos casos sintomáticos da doença são caracterizados por uma intensa resposta imunológica no tecido do hospedeiro (Cardona et al. 2003). Assim, o mecanismo fundamental pela qual a resposta imune do hospedeiro reage à cisticercose experimental e natural ainda está sendo esclarecida (Del Brutto et al. 2005).

1.6 *Taenia crassiceps*

A *Taenia crassiceps* é um helminto da família *Taenidae*, ordem *Cyclophyllidea* e classe *Cestoda*. A forma larval ou cisticerco é chamada de *Cysticercus longicollis*. Este mede em torno de 4-5 mm de diâmetro e apresenta escólex invaginado capaz de produzir inúmeros brotamentos na superfície de sua membrana (Freeman 1962; Maillard et al.1998). As formas adultas da *T. crassiceps* parasitam o intestino delgado de canídeos, especialmente raposas, coiotes e cães domésticos (Freeman 1962; Arocker-Mettinger et al.1992; Shimalov e Shimalov 2003). Estes por sua vez, eliminam em suas fezes as proglotes grávidas contendo os ovos, que são ingeridos por roedores, seus hospedeiros intermediários. Os embriões hexacanto (6 a 8 µm de diâmetro) eclodem no trato digestório dos hospedeiros intermediários e penetram pela mucosa, migrando por via linfática e ou sanguínea até se alojarem em um determinado órgão ou cavidade, onde se desenvolve a larva metacestóide ou cisticerco que se multiplica por diversos brotamentos formados a partir de sua membrana externa (Figura 2). Os brotamentos destacam-se do cisticerco inicial aproximadamente quatro semanas após seu surgimento. O hospedeiro definitivo (os canídeos), geralmente um predador do hospedeiro intermediário, ingere as larvas metacestóides e desenvolve o helminto adulto 34 a 70 dias após a infecção, sendo possível a visualização de ovos nas fezes depois de cinco a seis semanas. Os cisticercos são liberados durante a digestão da carne e o escólex desenvagina sob ação da bile, fixando-se no intestino delgado. Nestes hospedeiros a infecção se mantém naturalmente até um período de cerca de nove semanas e posteriormente, evolui para a cura espontânea. Em hospedeiros intermediários e acidentais (paratênicos) não foi relatada a cura espontânea (Freeman 1962; Maillard et al. 1998) (Figura 2).

T. crassiceps foi identificada primeiramente como um parasito de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), sendo encontrado principalmente na Europa (Freeman 1962). Porém, foi relatada sua presença na Grécia, parasitando raposas, lobos, chacais e gatos selvagens (Papadopoulos et al.1997). Na Alemanha foi descrito infectando texugos, raposas, fuinhas e gatos (Loos-Frank & Zeyhle 1982; Ballek et al. 1992; Wessbecher et al.1995; Pfeiffer et al.1997) além de outros. No entanto os hospedeiros mais comuns deste cestóide são roedores, sendo identificados também, em marmotas, lêmures, cães e gatos domésticos (Freeman 1962; Deblock & Petavy 1983; Dyer & Greeve 1998; Brojer et al. 2002).



Figura 2: Ciclo biológico da *Taenia crassiceps*, com seus hospedeiros definitivos, canídeos, (1) – ovo presente nas fezes (2) – hospedeiros intermediários, roedores (3) –, cisticerco (fase larval) (4) e hospedeiros paratênicos – mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos (5) (Adaptado de Freeman 1962; Vinaud et al. 2007).

Pode ainda ocorrer a cisticercose causada por *T. crassiceps* em humanos de forma acidental, atuando assim como hospedeiro paratênico deste parasito. A cisticercose humana por *T. crassiceps* ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos como indivíduos portadores de HIV (François et al. 1998) ou com neoplasias como o linfoma (Heldwein et al. 2006). No entanto, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver cisticercose por *T. crassiceps* (Arocker et al. 1992). Existem outros casos descritos na literatura de cisticercose no sistema nervoso central e no subcutâneo em animais domésticos como cães e gatos ressaltando a importância destes na transmissão e incidência da cisticercose humana por *T. crassiceps* (Wunschmann et al. 2003).

1.7 O modelo experimental da *Taenia Crassiceps*

A infecção de hospedeiros intermediários com cisticercos de *T. crassiceps* é um ótimo modelo experimental para se estudar os mecanismos da relação parasito-hospedeiro na cisticercose e neurocisticercose (Terrazas 2008). A fase larvária de *T. crassiceps* pertencente à cepa ORF, é utilizada atualmente como modelo experimental para estudo da cisticercose humana, por meio da inoculação dos cisticercos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c isogênicos sendo mantidos indefinidamente por inoculações subsequentes a cada 60 dias de infecção (Freeman 1962, Esch & Smyth, 1976). Os cisticercos provenientes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, podem ser divididos em três fases de acordo com seus aspectos macroscópicos. A fase inicial é caracterizada por um cisticerco translúcido e pequeno, que mede aproximadamente 2 µm de diâmetro (Figura 3A). O cisticerco na fase inicial aumenta seu tamanho, mantendo-se translúcido, porém com numerosos brotamentos em sua superfície, sendo denominado de cisticerco em fase larval (Figura 3B). No decorrer de seu desenvolvimento, ele torna-se mais opaco com poucos brotamentos, sendo chamado de cisticerco em fase final (Figura 3C) (Vinaud 2007). Sabendo-se que estas larvas não possuem escólex, portanto não têm a capacidade de desenvolver o helminto adulto, estes estudos da cisticercose intraperitoneal experimental vêm sendo realizados com relativa facilidade, pois, além de se multiplicarem rapidamente no peritônio do animal, estes cisticercos apresentam grande similaridade antigênica com cisticercos de *T. solium*, facilitando o estudo e a compreensão dos processos inflamatórios locais e sistêmicos, a fim de se avaliar a resposta geral do hospedeiro frente a este patógeno (Vaz et al. 1997).



Figura 3: Aspectos macroscópicos de cisticercos da *T. crassiceps* provenientes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas após 60 dias de infecção. (A) cisticerco em fase inicial; (B) cisticerco em fase larval e (C) cisticerco em fase final.

1.8 A resposta imune no modelo murino da neurocisticercose experimental

Uma vez no SNC, na fase inicial da infecção, os parasitos liberam glicoproteínas do seu tegumento no ambiente que ligam-se as lectinas na superfície das células do hospedeiro, sendo fagocitadas pelos macrófagos (Alvarez et al. 2008). Esta é uma das estratégias de evasão do sistema imune do hospedeiro utilizada pelo parasito. Diferente de outras infecções helmínticas, a resposta imune na NCC murina é do tipo Th1, porém, ela não resolve a infecção (Terrazas 2008). Possivelmente devido à estratégia de evasão.

Na NCC murina, baixas quantidades de parasitos podem ser hábeis em promover uma resposta inicial do tipo Th1 com o potencial de eliminar patógenos em pequenas quantidades (Alvarez et al. 2010). Porém, a resposta imune inicial pode estar diminuída pela ação de glicoconjugados liberados do tegumento dos cisticercos, utilizados como mecanismo de evasão e modulação da resposta imune.(Alvarez et al. 2008 e 2010). O acúmulo desses antígenos, que possuem uma natureza bioquímica complexa, no interior das células fagocitárias pode interferir nas vias intracelulares envolvidas com a apresentação de antígenos pelas moléculas de histocompatibilidade, inibindo a ativação das células T (Alvarez et al. 2010). Além de se ligarem a moléculas de iniciação das vias do complemento, impedindo a sua ativação, bem como linfócitos e produção de citocinas (White Jr et al., 2000).

Estudos realizados em modelos experimentais tem mostrado o aparecimento de uma abundante resposta inflamatória nos primeiro dois dias após a infecção. Os granulomas iniciais são predominantemente associados a uma resposta do tipo Th1 com abundantes neutrófilos, macrófagos, células natural killers (NK), células T gama-delta ($T\gamma\delta$), células T alfa-beta ($T\alpha\beta$); porém, em granulomas maduros observou-se uma mistura de resposta do tipo Th1 e Th2 (IL4). Portanto, a resposta do tipo Th1 parece exercer um importante papel na patogênese da doença e eliminação do parasito, enquanto que a IL-4 e a resposta do tipo Th2 estão envolvidas na inibição de uma forte resposta inicial (Prasad et al. 2008).

Uma das principais células responsáveis por essa resposta inflamatória do tipo Th1 são os linfócitos $T\gamma\delta$. O modelo murino de NCC utilizando o *Mesocostoides corti* foi o primeiro a descrever uma predominante resposta induzida pelas células $T\gamma\delta$ durante um estado de infecção (Cardona et al. 1999). Estes subtipos de linfócitos T participam como células imunorreguladoras promovendo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória do tipo Th1, além de orquestrar a imunopatogênese da NCC murina. Os linfócitos $T\gamma\delta$

produzem IL-2 e INF- γ que amplificam a resposta imune no SNC através de uma ativação indireta de várias populações de células imunes como macrófagos e células dendríticas, além de células residentes do cérebro como micróglia e astrócitos. Uma vez ativadas, essas células produzem diversas citocinas, quimiocinas e mediadores solúveis que ampliam a resposta inflamatória resultando em danos ao tecido do hospedeiro. Com o predomínio da resposta inflamatória do tipo Th1 inibindo uma resposta humoral do tipo Th2 (Cardona e Teale 2002). Na NCC humana, o papel desses linfócitos ainda está sendo estudado.

Observações feitas em modelos experimentais mostram uma resposta do tipo Th1 enquanto o parasito está intacto e uma resposta mista do tipo Th1/Th2 quando o parasito começa a ser destruído. Esses achados sustentam a opinião de que os parasitos mantêm o equilíbrio com a resposta imune do hospedeiro no início da infecção, assim, uma rápida resposta Th1 com produção de IgG é desencadeada, mas com o passar do tempo este equilíbrio é modificado para uma resposta Th2 que leva a uma destruição do parasito (Del Brutto et al. 2005).

A maioria dos casos de NCC sintomáticos é caracterizada por uma proeminente resposta imunológica no tecido nervoso do hospedeiro (White Jr et al. 2000), com uma resposta imune constituída de uma evidente resposta do tipo Th1 (Restrepo et al., 1998), ou um misto de Th1/Th2 e ainda Th3, que pode secretar TGF β induzindo o aparecimento de células Tregs, quando o parasito perde a capacidade imunomoduladora e começa a ser destruído, dependendo da presença ou ausência da formação de granuloma e do estágio da resposta granulomatosa (Restrepo et al. 2001).

Quando o parasito morre, e os granulomas se dissipam e uma resposta inflamatória Th1 prevalece, resultando em uma fase sintomática associada com graves lesões neurológicas e eventualmente morte do hospedeiro (White et al. 1997).

O modelo murino de NCC, utilizando o *Mesocestoides cortis*, é caracterizado por um acúmulo de parasitos e células inflamatórias em áreas extraparenquimatosas do encéfalo, incluindo as meninges e espaço subaracnóideo iniciando de 1-3 dias após a infecção (Cardona et al. 1999). Com o progresso da infecção, parasitos e células imunes penetram no parênquima cerebral e o grau de inflamação e infiltração leucocitária no SNC aumenta, sendo correlacionado com os sintomas clínicos, agravando-se. (Cardona et al. 1999; Sciutto et al. 2007). As citocinas produzidas pelas células infiltradas no SNC durante a infecção (IL-2, IL-12, IL-15, INF- γ e TNF- α) indicam uma resposta do tipo Th1 mediada por células. A

produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-4 (Th2) e IL-10 (Treg) são detectadas em baixos níveis (Cardona et al. 1999).

A resposta Th1 no modelo murino é mediada pelas células T $\gamma\delta$ (gama-delta) que infiltram precocemente durante a infecção e persiste durante praticamente todo o curso da NCC murina (Cardona et al. 1999). Porém, camundongos que perdem as células T $\gamma\delta$ apresentam uma inflamação no SNC reduzida, o que provoca menos lesões ao tecido do hospedeiro, devido à diminuição da expressão de citocinas do tipo Th1 (Cardona et al. 2002). Juntos esses dados indicam que a resposta inflamatória estimulada pelas células T $\gamma\delta$ exercem um importante papel no desenvolvimento da neuropatologia e severidade da doença (Restrepo et al. 2001).

A abundante liberação ou secreção de glicoproteínas observada em cestóides como o *Mesocostoides* e *Taenia* podem ser responsáveis pelo aumento da secreção de IL-4 ou IL-13 que provocam a indução dos macrófagos alternativamente ativados (aaMs), que atuam nas respostas à infecções helmínticas e reparo tecidual, podendo suprimir uma resposta Th2 nestas infecções. O papel exato dos aaMs no modelo murino da NCC permanece sendo determinado por provável regulação do equilíbrio Th1/Th2 para controlar a carga parasitária e diminuir os danos ao SNC (Alvarez et al. 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a NCC têm sido considerada uma doença emergente, devido ao aumento de casos notificados em países desenvolvidos com altas taxas de emigração de pessoas provenientes de áreas endêmicas. Por apresentar grande diversidade de manifestações clínicas, o que muitas vezes torna difícil o diagnóstico inicial dessa morbidade, grande correlação entre a resposta imune e inflamatória do hospedeiro e a gravidade da doença. Sendo assim, surge a necessidade de se estudar e compreender os mecanismos celulares e humorais envolvidos no desenvolvimento da NCC. O uso de modelos experimentais para a compreensão desses mecanismos tornou-se uma das principais ferramentas nos estudos científicos. O modelo utilizado para o estudo da cisticercose é o modelo de infecção intraperitoneal (Vaz et al. 1997), na maioria das vezes, com objetivo comparar com as lesões induzidas pela doença no SNC. Na literatura, o modelo utilizado para se induzir a NCC experimental, é o de Cardona et al., de 1999, que utilizam o *Mesocystoides cortis*. O modelo proposto por este trabalho utiliza a inoculação de cisticercos em estágio inicial *Taenia crassiceps* no encéfalo de camundongos para a indução da NCC. A escolha dos cisticercos de *T. crassiceps*, ocorreu devido à grande semelhança antigênica com a *Taenia solium*, agente da NCC humana, e devido aos casos de infecção em indivíduos imunodeficientes. O desenvolvimento deste modelo experimental se faz necessário para esclarecer os processos de interação parasito-hospedeiro no encéfalo dos camundongos no decorrer da infecção por cisticercos de *T. crassiceps*, auxiliando em uma possível intervenção ou utilização de fármacos que possam interferir nesses processos evitando assim uma maior destruição e comprometimento funcional do encéfalo.

A cisticercose experimental causada pela *T. crassiceps* em camundongos é bastante rápida e de fácil execução, ao contrário da infecção natural por cisticerco de *T. solium*, tornando possível o acompanhamento da lesão ao longo do tempo. No Brasil não foram relatados casos de infecção natural por *T. crassiceps*. Em nosso estudo foram utilizados camundongos com o perfil de respostas imunológicas diferentes (BALB/c convencionais e deficientes para IL-4, C57BL/6 convencionais e deficientes para INF γ), avaliando a resistência e/ou susceptibilidade à infecção em cada uma das espécies.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Analisar a formação da resposta inflamatória na neurocisticercose experimental em camundongos, determinando o papel das citocinas IL-4 e IFN γ na manutenção e viabilidade de cisticercos de *T. crassiceps*.

Objetivos específicos:

1. Analisar e comparar a resposta inflamatória provocada pela infecção experimental em camundongos C57BL6 e BALB/c convencionais.
2. Analisar e comparar a resposta inflamatória desencadeada pela infecção experimental em camundongos C57BL6 convencionais e C57BL6 desprovidos do gene de IFN γ .
3. Analisar e comparar a resposta inflamatória desencadeada pela infecção experimental em camundongos BALB/c convencionais e BALB/c desprovidos do gene de IL-4.

4. ARTIGOS

Manuscrito 1:

“ENCEFALITE EXPERIMENTAL POR CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* EM CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6”.

Manuscrito 2:

“A AUSÊNCIA DA IL-4 DIMINUI A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS INTRACRANIALMENTE COM CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*”

Manuscrito 3:

“IFN γ INDUZ MAIOR DESTRUIÇÃO DOS CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* INTRAVENTRICULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6.”

Manuscrito 1

ENCEFALITE EXPERIMENTAL POR CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* EM CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6.

Hidelberto MATOS-SILVA^{1,3*}, Bruno Pereira RECIPUTTI¹, Élbio CÂNDIDO DE PAULA², André Luiz OLIVEIRA¹, Vânia Beatriz Lopes MOURA¹, Marina Clare VINAUD¹, Milton Adriano Pelli OLIVEIRA¹, Ruy De Souza LINO JÚNIOR¹.

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

2. *Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.*

3. *Centro Universitário UNIRG, Gurupi-TO, Brasil.*

*. *Mestre em Medicina Tropical.*

Conflitos de Interesse: Este trabalho não apresenta conflitos de interesse.

Financiadora: CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa/ UFG (FUNAPE).

Endereço eletrônico: hidelmatos@ibest.com.br

Endereço postal: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. R. 235 S/N, Qd. 62 Lt. ar 1 – ST. Universitário. CEP: 74605-050. Goiânia-GO/Brasil. Telefone: (62) 3209 6165.

Artigo submetido à revista Arquivos de Neuro-psiquiatria.

Abstract

Objectives: Presentation of the experimental model of neurocysticercosis (NCC) caused by *Taenia crassiceps* cysticerci, description of the inflammatory process, susceptibility or resistance of BALB/c and C57BL/6 mice to this infection and description of the host-parasite relationship. **Methods:** The animals were intracranially inoculated with initial stage *T. crassiceps* cysticerci. They were euthanized at 7, 30, 60 and 90 days after the inoculation. Their encephala were removed for the histopathologic analysis, classification of the parasites and inflammatory lesions. **Results:** Experimental NCC was observed on both mice lineages. BALB/c mice presented inflammatory lesions with greater intensity, inducing necrosis on late stage parasites and with an acute inflammation pattern. While C57BL/6 mice showed greater capability on provoking early necrosis on the cysticerci showing a chronic inflammation pattern. **Conclusion:** This experimental model induced NCC on mice with characteristic inflammation and lesions. C57BL/6 mice were able to induce precocious necrosis of the parasites presenting inflammatory lesions with lower intensity.

Key words: neurocysticercosis, *Taenia crassiceps*, inflammation, BALB/c, C57BL/6.

Resumo

Objetivo: Apresentar o modelo experimental de neurocisticercose (NCC) com cisticercos de *Taenia crassiceps*, descrever a inflamação, susceptibilidade e resistência em camundongos BALB/c e C57BL/6, caracterizando melhor a relação parasito-hospedeiro. **Métodos:** Os animais foram inoculados intracranialmente com cisticercos em estágio inicial de *T. crassiceps*, eutanasiados aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI). Retirou-se os encéfalos para análise histopatológica, classificação dos parasitos e lesões inflamatórias. **Resultados:** Foi possível induzir NCC nas duas linhagens de camundongos com o modelo experimental. Os animais BALB/c apresentaram lesões inflamatórias com maior intensidade que nos C57BL/6, induziram necrose nos parasitos na fase tardia, com um padrão inflamatório agudo. Os C57BL/6 mostraram-se mais hábeis em provocar precocemente necrose nos cisticercos com padrão inflamatório crônico. **Conclusão:** O modelo induziu NCC com inflamação e lesões nos animais. Os C57BL/6 foram hábeis em induzir precocemente necrose nos parasitos, apresentando lesões inflamatórias com menor intensidade que nos BALB/c.

Palavras chave: *neurocisticercose*, *Taenia crassiceps*, *inflamação*, *BALB/c*, *C57BL/6*.

Introdução

A neurocisticercose (NCC) é uma das principais doenças parasitárias do sistema nervoso central (SNC) causada por cisticercos de *Taenia solium*¹, provocando significativa morbidade associada com crises convulsivas e hidrocefalia^{2,3}.

Considerada uma doença emergente em muitos países desenvolvidos, principalmente devido ao aumento de imigrantes oriundos de áreas endêmicas e dos poucos casos de transmissão local documentados^{3,4}. Segundo recente estudo com pacientes de clínicas neurológicas no estado do Texas – USA, 53% das internações ocorreram devido a NCC, sendo a epilepsia o principal sintoma clínico. Desses pacientes com NCC, 93% deles eram imigrantes hispânicos⁴. Por apresentar uma ampla diversidade clínica, a NCC têm sido alvo do desenvolvimento de diversos estudos clínicos, soroepidemiológicos e histopatológicos⁵, visando compreender os mecanismos envolvidos nas respostas imune e inflamatória⁶.

O uso de modelos experimentais para a compreensão da relação parasito-hospedeiro têm-se tornado uma excelente ferramenta para o estudo da cisticercose humana em diversos órgãos, incluindo sua forma mais grave, a NCC⁶. O parasito mais utilizado nos modelos experimentais de cisticercose é a *Taenia crassiceps*, por apresentar rápido ciclo de desenvolvimento, facilidade de manutenção e similaridade antigênica com a *T. solium*^{7,8}. O modelo experimental intraperitoneal⁷ é o mais difundido, útil na avaliação dos fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade e resistência do hospedeiro, principalmente nos mecanismos imunológicos⁹. O modelo experimental mais descrito na literatura para o estudo da NCC é o de Cardona et al.¹⁰, que utiliza o *Mesocostoides corti*^{10,11}.

De acordo com a literatura, camundongos BALB/c são menos resistentes que os C57BL/6 à infecção intraperitoneal experimental com cisticercos de *T. crassiceps*⁹. Enquanto que na forma mais acentuada da doença, a NCC, as informações sobre os mecanismos inflamatórios e imunológicos do hospedeiro, bem como e dos mecanismos de evasão do parasito permanecem escassas. Sabe-se que no início da infecção intraperitoneal, ocorre uma resposta inflamatória, com citocinas do tipo 1, controlando o crescimento do parasito. Porém, rapidamente a resposta se modifica, para o tipo 2 ou ainda um misto dos tipos 1 e 2, tornando-se permissiva ao crescimento parasitário. A resposta imune do tipo 2, resulta em um crescimento irrestrito do parasito, podendo levar o hospedeiro à morte nos casos experimentais, demonstrando pouca ou nenhuma resistência imunológica ao crescimento parasitário^{12,13}.

Os objetivos do presente trabalho foram desenvolver um modelo experimental que pudesse induzir a NCC em camundongos utilizando cisticercos de *T. crassiceps*, e o outro, observar as diferenças na reação inflamatória e lesões decorrentes desta infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6, bem como observar susceptibilidade e resistência.

Materiais e métodos

Manutenção do ciclo. O ciclo biológico da *T. crassiceps* (cepa ORF) vem sendo mantido no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), em camundongos BALB/c fêmeas infectadas intraperitonealmente com cisticercos desde 2002. Após 90 dias de infecção, os camundongos são eutanasiados e necropsiados para retirada de cisticercos em estágio inicial¹⁴ que são lavados várias vezes com salina estéril e posteriormente inoculados na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas não infectadas¹⁵.

Animais. Utilizou-se camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 convencionais cujas matrizes vem sendo mantidas no Biotério do IPTSP/UFG. Para o delineamento do experimento, utilizaram-se animais de 8 a 12 semanas de idade e 20 a 30 gramas de peso. Estes foram inoculados intracranialmente com 3 a 5 cisticercos em estágio inicial e distribuídos em quatro grupos contendo cinco camundongos por dia experimental (7, 30, 60 e 90), sendo eles: Grupo 1 – BALB/c infectados com cisticercos; Grupo 2 – BALB/c inoculados com solução salina estéril; Grupo 3 – C57BL/6 infectados intracranialmente com cisticercos; Grupo 4 - C57BL/6 inoculados com salina estéril. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação em Animais (CEEA/CEP-UFG), protocolo número 034/09.

Infecção experimental. Para a realização da inoculação, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com solução anestésica de Cetamina 100mg/ml e Xilazina 20mg/ml na proporção de 0,1ml/10g^{16,17}. Após tricotomia da porção superior da cabeça seguida por antisepsia com iodo tópico, uma incisão longitudinal e mediana na pele do crânio foi feita com lâmina de bisturi. O orifício de trepanação foi realizado com uma broca (44,5mmX2mm) movida por micromotor (LB100 – Beltec)¹⁸ na topografia do osso parietal direito a 3mm da linha média (sutura sagital) e 3mm posterior à sutura coronal a 4mm de profundidade. Os animais infectados foram inoculados intracranialmente com cisticercos e em seguida, o orifício de trepanação foi fechado com massa plástica estéril e a incisão suturada.

Retirada dos encéfalos para análise. Aos 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,1ml/10g da solução de Xilazina a 2% e Cetamina a 10%. Posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, para a coleta do encéfalo para posterior análise.

Análise Histopatológica. A análise histopatológica foi realizada com fragmentos de encéfalos fixados em formaldeído a 3,4% tamponado, desidratados em álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, confeccionados blocos e posteriormente cortes com 5 µm de espessura. Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro e posteriormente, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) ou outras técnicas histoquímicas quando necessário, tais como; picro-sírius, para a identificação de fibrose; ácido periódico de Schiff (PAS), para depósito de radicais glicídicos; von Kossa, para depósito de sais de cálcio e Vermelho Congo para beta-fibrilose¹⁹.

Quantificação de cisticercos e classificação em etapas de desenvolvimento. Por meio da microscopia descreveu-se a localização anatômica dos cisticercos e classificou-se de acordo com o estágio de desenvolvimento em inicial, larval e final¹⁴.

Análise dos Processos Patológicos Gerais. Os processos patológicos gerais foram analisados no parasito, na interface parasito-hospedeiro e no tecido do hospedeiro observando: infiltrado inflamatório (parênquima, meninges e vasos) e seu perfil celular, edema, hiperemia, calcificação, fibrose, deposição de radicais glicídicos, além de alterações como gliose e microgliose. Os processos patológicos descritos foram classificados de forma semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreto com comprometimento de até 25% da área, moderado de 26 a 50% e acentuado acima de 50% de comprometimento¹⁹.

Análise Estatística. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 3.5. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição não normal, as variáveis foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

Todos os cisticercos observados no experimento foram localizados nos ventrículos cerebrais provocando inflamação, expansão dessa cavidade e consequentemente o desvio da linha média com maior intensidade nos animais BALB/c (Figuras 4 e 5; Tabelas 1 e 2).

Observou-se também uma diminuição na consistência e hipotrofia do parênquima em ambas as linhagens. Aos 7 DAI, os cisticercos encontravam-se no estágio inicial de desenvolvimento em ambas as linhagens, enquanto que, aos 30 DAI encontrou-se cisticercos em estágio intermediário somente nos animais C57BL/6 (Figura 3-A a D). Cisticercos em estágio final foram observados nos animais C57BL/6 mais precocemente que nos BALB/c, isto é, aos 60 DAI (Figura 6-E e F). Por outro lado, apenas aos 90 DAI foram vistos cisticercos em estágio final nos BALB/c (Figura 6-G; Tabela 1), além disso, o infiltrado inflamatório ao redor dos cisticercos foi mais intenso que nos C57BL/6 (Figura 6-H; Tabela 1). Parasitos em estágio final também apresentaram discretas áreas de fibrose e a deposição de material glicídico que mostrou-se diminuído, além de apresentarem necrose.

Ao analisar os processos na interface parasito-hospedeiro dos camundongos BALB/c, observou-se infiltrado inflamatório intraparenquimatoso com predomínio de polimorfonucleares, já nos animais C57BL/6 esse predomínio foi de células mononucleares. A perivasculite aos 30 DAI nos animais BALB/c foi significativamente maior. Enquanto que a hiperemia nos C57BL/6 foi maior ao longo de todo o experimento (Tabela 2). Nos controles apenas discreta hiperemia e edema foram observados aos 7 DAI, não sendo observadas nos dias experimentais posteriores.

Analisando as reações no tecido do hospedeiro, como em regiões do parênquima cerebral próximas aos ventrículos, verificou-se que os camundongos BALB/c apresentavam ependimite, e principalmente, edema e meningite mais intensos que na outra linhagem durante a análise de todo o processo inflamatório. Somente a hiperemia foi mais intensa nos C57BL/6 (Tabela 3). Em todos os animais infectados dos grupos de 60 e 90 DAI, foram observadas discretas áreas de fibrose na região do epêndima próxima aos parasitos (Tabela 2). Microgliose ocorreu logo aos 7 DAI nos animais C57BL/6, enquanto que nos BALB/c essa alteração só foi observada aos 30 DAI, nesse mesmo tempo experimental e grupo observou-se uma gliose de maior intensidade em relação a outra linhagem. Discretas áreas de calcificação foram encontradas no parênquima cerebral, na região do *putâmen* caudal no grupo dos C57BL/6 infectados aos 90 DAI (Tabela 2).

Discussão

As duas linhagens de camundongos utilizadas no presente estudo, conseguiram induzir necrose nos parasitos aos 90 DAI, porém, nos C57BL/6 essa destruição ocorreu de forma mais eficiente já aos 60 DAI. Apesar disto, a inflamação composta principalmente por células polimorfonucleares associadas ao edema, perivascularite e meningite, nos animais BALB/c foi significativamente maior que nos C57BL/6 durante o experimento. Fragoso et al.⁹, ao inocularem intraperitonealmente animais BALB/c com cisticercos de *T. crassiceps*, observaram que estes apresentavam uma carga parasitária maior do que os animais C57BL/6, sendo então considerados susceptíveis a infecção por cisticercos de *T. crassiceps*. Acredita-se que essa pouca habilidade em provocar necrose precoce dos parasitos nos animais BALB/c tenha ocorrido devido ao predomínio de polimorfonucleares no infiltrado inflamatório ao longo de toda a infecção, por outro lado, aos 60 DAI nos C57BL/6 já existia um predomínio de mononucleares. Provavelmente, devido a esse fato, a intensidade da ventriculomegalia, destruição do parênquima adjacente, desvio da linha média e gliose tenham sido maiores no grupo dos BALB/c.

Na fase inicial (7 e 30 DAI) da inflamação nos animais BALB/c foi possível observar lesões, tais como a gliose, no parênquima adjacente aos ventrículos laterais. O que possa ter ocorrido devido ao tipo de resposta imune desencadeada (celular ou humoral), controle do crescimento parasitário e expansão dos ventrículos, ou ainda, devido à presença de antígenos circulantes. Relatos na literatura descreveram não haver a necessidade da presença de cistos intraventriculares para o desenvolvimento de alterações como ventriculomegalia e até obstrução da circulação líquórica, bastando à presença dos antígenos circulantes do parasito e mesmo sem reação inflamatória na cavidade^{20, 21, 22}. A ativação e proliferação das microglias, denominada de microgliose, foi discretamente maior nos animais C57BL/6 no decorrer do experimento. O que corrobora com o perfil de resposta mais celular, do tipo 1, apresentado por estes animais²³. Estas células são as principais guardiãs do sistema nervoso central. Uma vez ocorrendo lesão no tecido encefálico, as microglias passam por um processo de ativação onde sua morfologia, características fenotípicas superficiais, hipertrofia e aumento da expressão de receptores para o complemento, como o CR3, além do aumento da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) modificam-se tornando-as células mais hábeis em defender e estimular regeneração do tecido nervoso destruído^{24, 25}.

Na fase tardia (60 e 90 DAI), apesar dos BALB/c apresentarem uma intensidade maior de infiltrado inflamatório do que os C57BL/6, estes últimos foram mais hábeis em

conter o crescimento dos cisticercos e induzir a morte destes. O infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares foi uma característica marcante nos animais BALB/c infectados, enquanto que nos C57BL/6 o predomínio do perfil celular foi de mononucleares. Fragoso et al.²³, avaliando a susceptibilidade e resistência em infecções intraperitoneais com cisticercos de *T. crassiceps* com essas duas linhagens de camundongos, já haviam observado que os animais C57BL/6 apresentavam menor crescimento parasitário, menor desenvolvimento de lesões e uma resposta predominantemente do tipo 1, já nos BALB/c a resposta imune era predominantemente do tipo 2, humoral^{26,27}. Todos os indivíduos dos grupos infectados de ambas as linhagens apresentaram discretas áreas de fibrose, o que demonstra destruição tecidual em virtude da ação do parasito e da resposta inflamatória do hospedeiro, com o intuito de eliminar o patógeno e finalizar o processo inflamatório. Nos grupos controles, também foram observados edema e hiperemia discretos nos primeiros dias da fase inicial da infecção, não sendo novamente observados nos dias experimentais subsequentes, o que provavelmente ocorreu devido ao procedimento de inoculação.

As áreas de calcificação distrófica observadas em alguns animais infectados da linhagem dos C57BL/6 aos 90 DAI, está de acordo com outros trabalhos^{19, 28}. Segundo a classificação da NCC humana proposta por Cuetter et al.²⁸, na forma intraventricular ativa pode ocorrer obstrução da circulação do líquido e áreas hipodensas na ressonância magnética, enquanto que na forma inativa ocorre hidrocefalia tardia mas sem áreas de calcificação adjacentes. Provavelmente a forte resposta imune celular do tipo 1, característica dos animais C57BL/6^{6,9}, tenha sido a responsável em provocar danos aos tecidos adjacentes logo na fase inicial da infecção, resultando na contenção do crescimento, rápida morte do parasito e calcificação.

O modelo experimental apresentado neste trabalho utilizando cisticercos de *T. crassiceps* pode se tornar um método reprodutivo para o estudo da NCC humana, por provocando transitoriamente, discreta hiperemia e edema nos animais controles. O uso dos cisticercos de *T. crassiceps* foi outra vantagem apresentada, devido ao seu rápido ciclo de desenvolvimento, facilidade de manutenção e por pertencer ao gênero *Taenia*, apresentando assim, maior similaridade antigênica com a *T. solium*^{7,8}. O modelo experimental de NCC descrito na literatura não utiliza o cisticercos do gênero *Taenia*, e sim o *Mesocostoides corti*^{10,11}. Os principais trabalhos relacionados à resposta imune e inflamatória no estudo da cisticercose, utilizando cisticercos de *T. crassiceps*, usam o modelo de infecção intraperitoneal⁹. O modelo proposto por este trabalho, pode reproduzir a NCC, possibilitando

o estudo de inoculações de cisticercos em diversas áreas do encéfalo, como no hipocampo correlacionando com crises convulsivas, forma clínica muito comum da doença no ser humano.

Assim sendo, foi possível induzir NCC nas duas linhagens de camundongos utilizando o modelo experimental apresentado neste trabalho, obtendo lesões e alterações tais como: ventriculomegalia, perivascularite, meningite, microgliose e inflamação. Com a observação dos processos patológicos nos encéfalos retirados dos animais infectados, pode-se concluir que os camundongos BALB/c são menos eficientes em induzir necrose nos parasitos de forma precoce, além de apresentarem um perfil inflamatório agudo. Enquanto que os C57BL/6 mostraram-se mais hábeis em provocar a morte dos parasitos, perfil inflamatório crônico, menor intensidade nas alterações e lesões sendo portanto, considerados mais resistentes.

Agradecimentos

Apoio financeiro CNPq e FUNAPE (Fundação de Amparo à Pesquisa).

Referências Bibliográficas

1. Agapejev S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil: Análise crítica. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61(3-B): 822-828.
2. White Jr A.C. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annual Review of Medicine* 2000; 51:187-206.
3. Prasad, K. N., Prasad A., Gupta, R. K., Nath K., Pradhan, S., Tripathi, M. and Pandey, C. M. Neurocysticercosis in Patients with Active Epilepsy From a Pig Farming Community. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2009; 103: 144-150.
4. White Jr, A.C.; Serpa, J.A.; Graviss, E. A.; Kass, J. S. Neurocysticercosis in Houston, Texas an update. *Medicine* 2011; 90: 81-86.
5. Del Brutto OH, Santibanez R, Idrovo L, Rodriguez S, Diaz-Calderon E, Navas C, Gilman RH, Cuesta F, Mosquera A, Gonzalez A E, Tsang V C and Garcia HH. Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador. *Epilepsia* 2005; 46: 583–587.

6. Terrazas, I.L. The Complex role of pro- and Anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: Immunological Lessons from Experimental and Natural Hosts *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 383-392.
7. Sciutto, E.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Montoya, R. M.; Diaz, M. L.; Govezensky, T.; Lomeli, C.; Tapia, G. and Larralde C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990; 12: 687–696.
8. Sciutto, E.; Chavarria, A.; Fragoso, G.; Fleury, A.; Larralde, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology* 2007; 29: 621-636.
9. Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Hernandez M., Sciutto E. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa-2 Transgenic Mice. *Infection and Immunity* 1998; 66 (2): 760-764.
10. Cardona, A.E.; Restrepo, B.I.; Jaramillo, J.M.; Teale, J.M. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J. Immunol* 1999; 162: 995-1002.
11. Alvarez, J.I., Mishra, B.B., Gundra U.M., Mishra, P.K., Teale, J.M. *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 2010; 137: 359-372.
12. Toenjes, S. A., R. J. Spolski, K. A. Mooney, and R. E. Kuhn. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 1999; 118: 623–633.
13. Kuhn R. E., Aldridge J. R., Johnson E. C. Cpg stimulates protective immunity in Balb/Cj mice infected with Larval *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol* 2010; 96(5): 920–928.
14. Vinaud, M.C.; Ferreira, C.S.; Lino Jr., R.S.; Bezerra, J.C.B. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology* 2008; 120: 221-226.
15. Vaz, A. J. C. M. Nunes, R. M. Piazza, J. A. Livramento, M. V. Da Silva, P. M. Nakamura e A. W. Ferreira. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57 (3): 354-357.

16. CETEA-UFMG 2008. Protocolos Anestésicos. Available at www.ufmg.br/bioetica/cetea/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=22. Accessed: 08/24/2011.
17. Alvarez, J. I., Rivera, J. and Teale, J. M. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. PLoS Neglected Tropical Diseases 2008; 2 (4): e218.
18. Michailowsky, C. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. Arq Neuropsiquiatr 2003; 61(2-A): 234-240.
19. Lino-Jr, R. S., Ribeiro, P. M., Antonelli, E. J., Faleiros A. C., Terra, S. A., Reis, M. A. e Teixeira, V. P. A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35: 617-622.
20. Garcia, H.H; Gonzalez, A.E.; Gilman, R.H. Cysticercosis Working Group in Peru. Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg 2002; 66: 427-430.
21. Agapejev S., Pouza A.F.P, Bazan R., Faleiros A.T.S. Aspectos clínicos e evolutivos da hidrocefalia na neurocisticercose. Arq Neuropsiquiatr 2007; 65(3-A): 674-680.
22. Gasparetto E.L., Eiras de Araújo A.L., Rodrigues R.S., Marchiori E., Pinheiro R.A., Flores M., Alves J.R.D. Migrating intraventricular cysticercosis. Arq Neuropsiquiatr 2008; 66(1): 111-113.
23. Fragoso, G., Meneses, G., Sciutto, E., Fleury, A. and Larralde, C. Preferential Growth of *Taenia crassiceps* Cysticerci in Female Mice Holds across several Laboratory Mice Strains and Parasite Lines. J. Parasitol 2008; 94(2): 551–553.
24. Sreit J.W., Sharon A.W., Pennel A.N. Reactive microgliosis. Progress in Neurobiology 1999; 57: 563-581.
25. Ransohoff R. M. Microgliosis: the questions shape the answers. Nature Neuroscience 2007; 10 (12): 1507-1509.
26. Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. J Steroid Biochem Molec Biol 1995; 52: 575-580.
27. Villa, O.F. and Kuhn, R.E. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. Parasitology 1996; 112: 561-570.

28. Cuetter, A.C.; Garcia-Bodadilha, Guerra, J. L.G.; Martinez, F.M.; Kaim, B. Neurocysticercosis: Focus on Intraventricular Disease. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24:157-64.

Anexos

Tabela 1: Reação inflamatória nos parasitos encontrados em camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental com cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	BALB/c				C57BL/6			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Estádio Des.	INI	INI	LAR	FIN	INI	LAR	FIN	FIN
Localização	VL	VL	VL/3º VD	VL	VL	VL	VL	VL
I.I. (PMN/MN)	-	-	++	+++	+	+	++	++
Calcificação	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	-	-	-	+	-	-	-	+
Depósito de glicogênio	-	-	+++	+	+	+++	+	+

Legenda: INI (Inicial), LAR (Larval), FIN (Final), PMN (Polimorfonucleares), MN (Mononucleares), I.I. (infiltrado inflamatório), + (discreto), ++ (moderado), +++ (acentuado), n=5 por dia experimental.

Tabela 2: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro em camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	BALB/c				C57BL/6			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Ventriculomegalia	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
Hiperemia	+	+	++	+	+	++	++	++
Perivascularite	+	++*	++	+++	+	++*	++	++
I.Inf. – PMN	+	++	++	+++	+	+	+	+
I.Inf. – MN	+	+	++	++	+	++	++	++

Legenda: PMN (Polimorfonucleares), MN (Mononucleares), + (discreto), ++ (moderado), +++ (acentuado), n=5 por dia experimental.* $p < 0,05$.

Tabela 3: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro de camundongos BALB/c e C57BL/6 submetidos à infecção experimental por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	BALB/c				C57BL/6			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Calcificação	-	-	-	-	-	-	-	+
Fibrose	-	-	+	+	-	-	+	+
D. glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-
Microgliose	-	+	+	+	+	+	+	+
Meningite	-	+	++*	+	+	+	++	+
Gliose	+	++	+	+	-	+	+	+
Edema	+	++	+	+	+	++	+	+
Hiperemia	+	+	+	+	+	++	+	++
Ependimite	+	+	+	++	-	+	+	+
Perivascularite	+	++	++	+++	+	++	++	++
I.Inf. – PMN	+	++	++	+++	++	+	+	+
I.Inf.– MN	+	+	++	++	++	++	++	++

Legenda: PMN (Polimorfonucleares), MN (Mononucleares), + (discreto), ++ (moderado), +++ (acentuado), n=5 por dia experimental. * $p < 0,05$.

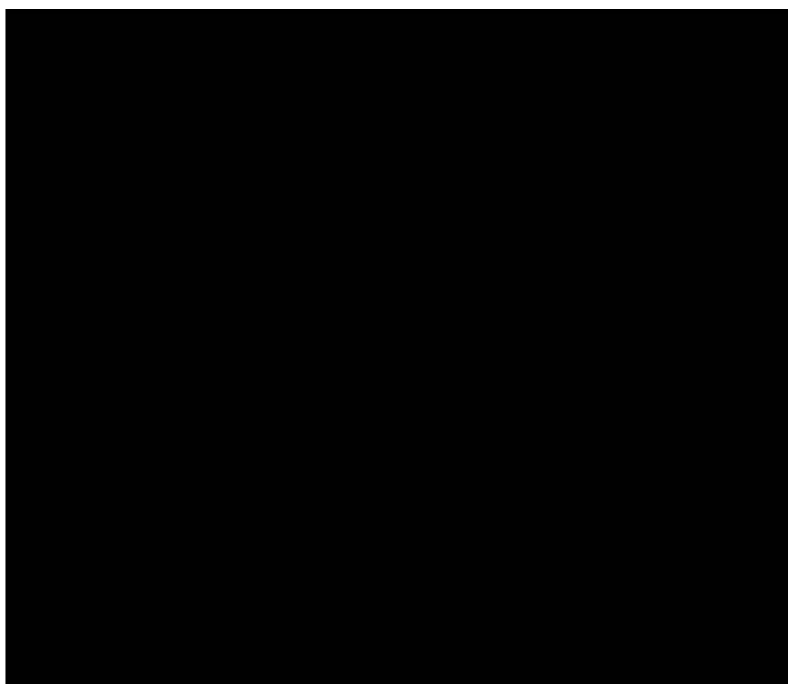


Figura 4: Mesoscopia do encéfalo de camundongo BALB/c 60DAI, com presença de cisticerco em estágio larval de desenvolvimento no interior do terceiro ventrículo dorsal, hiperemia nos vasos adjacentes e infiltrado inflamatório (HE, escala = 5mm).

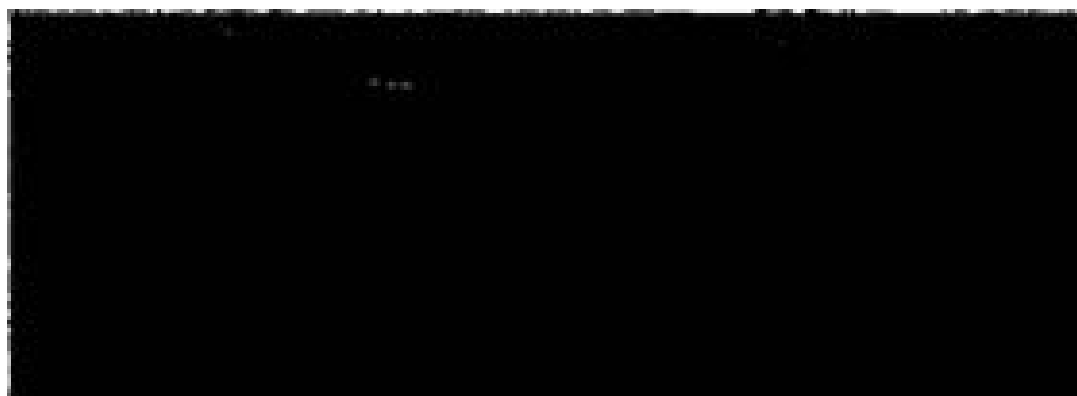


Figura 5: Mesoscopia de encéfalo de camundongos BALB/c (A) e C7BL/6 (B) convencionais em corte coronal, apresentando cisticerco induzindo ventriculomegalia e desvio da linha média (escala = 1 mm).



Figura 6: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c e C57BL/6 convencionais. Aos sete dias após a infecção observou-se: (A) BALB/c com pequena área de necrose próxima ao ventrículo lateral (seta) e discreto infiltrado inflamatório; (B) C57BL/6 com cisticercos em estádios inicial e larval (setas) de desenvolvimento no interior do ventrículo lateral e discreta ependimite (cabeça de seta). Aos 30 DAI: (C) BALB/c com destruição da parede ventricular, presença de cristais de colesterol (seta) e discreto infiltrado inflamatório; (D) C57BL/6 com discreta meningite (seta). Aos sessenta dias após a infecção observou-se: (E) BALB/c apresentando cisticerco em estágio larval de desenvolvimento (seta) no ventrículo lateral; (F) C57 BL/6 com cisticerco em estágio final (seta) e infiltrado inflamatório ao redor do parasito no ventrículo lateral. Aos noventa dias após a infecção, observou-se: (G) BALB/c apresentando cisticerco em estágio final de desenvolvimento (seta) com infiltrado inflamatório acentuado ao redor do parasito e (H) C57BL/6 apresentando perivascularite moderada (seta) (HE, escala = 100µm).

Manuscrito 2

“A AUSÊNCIA DA IL-4 DIMINUI A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS INTRACRANIALMENTE COM CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*”

Hidelberto Matos Silva^{1,3}, Patrícia Nagib Loyola¹, Bruno Pereira Reciputti¹, Élbio Cândido de Paula², André Luiz Oliveira¹, Vânia Beatriz Lopes¹, Marina Clare Vinaud¹, Milton Adriano Pelli Oliveira¹, Ruy de Souza Lino Júnior¹.

*1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás,
Goiânia-Go, Brasil*

2 Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás

3 Centro Universitário UNIRG, Gurupi-TO, Brasil.

Palavras chave: *neurocisticercose, Taenia crassiceps, inflamação, BALB/c.*

Artigo a ser submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Abstract

Neurocysticercosis (NCC) is a world widely distributed disease caused by the larval stage of *Taenia solium* and is considered one of the most important infections of the central nervous system. Few are the studies with experimental models of NCC and the most used model utilizes BALB/c female mice inoculated with *Mesocestoides corti*. This study aimed the analysis of IL-4 influence in the inflammatory response caused by the experimental model of NCC which uses *T. crassiceps* cysticerci. We used conventional BALB/c mice and BALB/c mice which lacked the IL-4 gene (KO-IL-4) which were inoculated via intracranial with cysticerci and euthanized at 7, 30, 60 and 90 days after the infection (DAI). The absence of IL-4 induced greater parasitism in those animals. In the initial phase of the infection the KO-IL-4 animals presented less intensity in the inflammatory infiltration in the host-parasite interface with polymorphonuclear cells and intraparenchymatous edema. Also in those animals in the late phase of infection there was less development of ventriculomegaly, inflammation in host tissues and meninges and it also favored the cysticerci survival. Both lineages were capable of destroying the cysticerci at 90 DAI, however in the animals with IL-4 absence it was possible to find larval stage cysticerci at this experimental period. According to the anatomicopathological and inflammatory process analysis in those animal brains we believe that the absence of IL-4 induces less intensity of the inflammatory infiltration, less ventriculomegaly and perivascularitis.

Resumo

A Neurocisticercose (NCC) é uma doença amplamente distribuída no mundo causada pelo estágio larval da *Taenia solium*, sendo considerada uma das mais importantes infecções do sistema nervoso central. Poucos são os estudos com modelos experimentais de NCC, o mais estudado utiliza camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com *Mesocestoides corti*. Objetivou-se no presente trabalho analisar a influência da IL-4 na resposta inflamatória desencadeada pelo modelo experimental de NCC utilizando cisticercos de *Taenia crassiceps*. Utilizou-se camundongos BALB/c convencionais e BALB/c desprovidos do gene para IL-4 (KO-IL-4) inoculados intracranialmente com cisticercos e eutanasiados aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI). A ausência da IL-4 induziu um maior parasitismo nos animais. Na fase inicial da infecção os animais KO-IL-4 apresentaram menor intensidade no infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro com polimorfonucleares e edema intraparenquimatoso. Ainda nos animais KO-IL-4, na fase tardia, houve menor desenvolvimento de ventriculomegalia, inflamação no tecido do hospedeiro e nas meninges, além de favorecer maior sobrevivência dos cisticercos. As duas linhagens foram capazes de destruir cisticercos aos 90 DAI, porém nos animais com ausência de IL-4, ainda encontrou-se cisticercos em estágio larval nesse período experimental. De acordo com as análises anatomopatológicas bem como do processo inflamatório nos encéfalos dos animais, acredita-se que a ausência da IL-4 induza uma menor intensidade no infiltrado inflamatório, menor ventriculomegalia e perivascularite.

Introdução

A Neurocisticercose (NCC) é uma doença amplamente distribuída no mundo causada por *Cysticercus cellulosae*, um estágio larval da *Taenia solium*, sendo considerada uma das mais importantes infecções do sistema nervoso central (SNC) e um problema de saúde pública negligenciado, principalmente em países em desenvolvimento (Garcia et al. 2002; Prasad et al. 2008).

Estima-se que aproximadamente 50 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 50 mil morram por cisticercose anualmente, sendo que 32 milhões de pessoas infectadas encontram-se na África, onze milhões na Ásia e três milhões nas Américas. Na América Latina cerca de dezoito países apresentam casos de cisticercose, tais como: Argentina, Venezuela, México, Colômbia, Guatemala, Uruguai e Brasil (Flisser 1991; MMWR 1992; WHO 2010).

Nos últimos tempos, a morbidade tem aumentado também em países desenvolvidos devido à grande imigração de indivíduos albergando o parasito, provenientes de regiões endêmicas (Prasad et al. 2008; White Jr et al. 2011). A doença apresenta amplo polimorfismo clínico e laboratorial o que dificulta seu diagnóstico. Pode ser assintomática ou se manifestar através de vários sintomas inespecíficos tais como: cefaléia, hipertensão intracranial, epilepsia, demência e depressão. A manifestação dos sintomas é resultante da interação parasito-hospedeiro e da intensidade da resposta inflamatória ao redor do parasito e à distância. De acordo com estudos clínicos e epidemiológicos a NCC apresenta alta prevalência em vários estados brasileiros como o Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Agapejev et al. 2003 e 2007).

Na resposta imune, as citocinas exercem um importante papel na organização das respostas essenciais para o controle e eliminação parasitária. A produção de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12p40 no início da infecção, tem sido associada com a indução de uma forte resposta imune celular que é importante para a eliminação de parasitos intracelulares. Essas citocinas estão associadas a uma resposta do tipo 1. Enquanto que as IL-4, IL-5 e IL-13 participam da resposta imune humoral produzindo anticorpos, que estão classicamente associados com a imunidade a parasitos extracelulares, caracterizando uma resposta imune do tipo 2 (Maizels et al. 2003).

Na cisticercose experimental intraperitoneal por *Taenia crassiceps*, modelo mais utilizado para estudo da cisticercose, ocorre inicialmente uma resposta do tipo 1, modificando

em seguida para uma forte polarização de resposta do tipo 2, três ou quatro semanas após a infecção (Villa & Kuhn 1996; Terrazas et al. 2008). A modificação ocorre devido a habilidade inerente do parasito e seus antígenos em modular a resposta imune. Uma resposta inicial do tipo 1 está associada com um baixo crescimento parasitário, ao passo que a tipo 2 com o aumento da carga parasitária (Terrazas et al. 2008). Neste período, grandes quantidades de IFN- γ e anticorpos IgG2a antígeno-específico são detectados e a atividade dos macrófagos parece ser próinflamatória, comprovada pelos altos níveis de IL-12 e óxido nítrico (NO) produzidos. Para que o parasito possa sobreviver à resposta do hospedeiro, ele modifica rapidamente a resposta do tipo 1 para uma predominantemente do tipo 2. Como consequência, os níveis de IgG2a, IFN- γ e macrófagos com atividade próinflamatória diminuem ao passo que os níveis de IgG1, IgE, IL-4, IL-13 e IL-5 aumentam. Nesse caso, uma resposta imune com perfil do tipo 2, considerada protetora contra infecções helmínticas, torna-se prejudicial ao hospedeiro ao favorecer a permanência e crescimento do helminto (Rodriguez-Sosa et al. 2002).

Estudos utilizando o modelo experimental de infecção intracranial com cisticercos de *Mesocostoides corti* (Cardona et al., 1999), tem sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel das células de defesa e das citocinas (Cardona et al. 2002, 2003), expressão e distribuição de receptores Toll-like (Alvarez et al. 2010), migração de leucócitos no SNC (Alvarez et al. 2006, 2007, 2008), estudo das proteínas do complexo juncional e estratégias de evasão imune (Alvarez et al. 2008). Segundo dados desses estudos, a resposta imune durante a infecção intracranial está associada com uma resposta predominantemente do tipo 1, o que parece ocorrer direcionado pelos linfócitos T $\gamma\delta$ (gama-delta), que chegam ao local de infecção logo nos primeiros dias após a infecção e permanecem durante todo o curso, induzindo um aumento na produção de citocinas próinflamatórias e uma maior resposta celular local (Terrazas et al. 2008). Respostas imunes do tipo 2, em estudos desenvolvidos, inoculando intraperitonealmente cisticercos de *T. crassiceps* em camundongos BALB/c, estes apresentaram maior crescimento parasitário e uma resposta permissiva (Larralde et al. 1995; Terrazas et al. 1998; Villa & Kuhn 1996, Fragoso et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da IL-4 na resposta inflamatória e reações anatomopatológicas desencadeadas em camundongos BALB/c convencionais e desprovidos do gene para essa citocina (KO-IL-4), inoculados intracranialmente com cisticercos de *T. crassiceps* utilizando o modelo experimental de NCC.

Materiais e métodos

Manutenção do ciclo. O ciclo biológico da *T. crassiceps* (cepa ORF) vem sendo mantido no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), a partir de camundongos BALB/c fêmeas infectadas com cisticercos desde 2002. Após 90 dias de infecção, os camundongos são eutanasiados e necropsiados para retirada de cisticercos em estágio inicial (Vinaud et al. 2008) e posteriormente inoculados na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas não infectadas (Vaz et al. 1997).

Animais. Utilizou-se camundongos fêmeas BALB/c convencionais e desprovidos do gene de IL-4 (KO-IL-4) cujas matrizes foram doadas pela Dr. Nancy Noben-Trauth (NIH, Bethesda, MD, USA). As matrizes foram mantidas no Biotério do IPTSP/UFG. Para o delineamento do experimento, utilizaram-se camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, com o peso de 20 a 30 gramas. Os camundongos foram inoculados intracranialmente e distribuídos em quatro grupos contendo cinco camundongos por dia experimental, sendo eles: Grupo 1 – 20 camundongos BALBc convencionais infectados intracranialmente com cisticercos de *T. crassiceps*; Grupo 2 – 20 camundongos BALBc convencionais inoculados intracranialmente com solução salina; Grupo 3 – 20 camundongos BALB/c KO-IL-4 infectados intracranialmente com cisticercos de *T. crassiceps*; Grupo 4 - BALB/c KO-IL-4 inoculados intracranialmente com solução salina. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação em Animais (CEEA/CEP-UFG), protocolo número 034/09.

Infecção experimental. Para a realização da inoculação, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com uma solução anestésica de Cetamina 100mg/ml e Xilazina 20mg/ml na proporção de 0,1ml/10g (CETEA-UFMG 2008, Alvarez et al., 2008). Após tricotomia da porção superior da cabeça seguida por antissepsia com iodo tópico, uma incisão longitudinal e mediana na pele do crânio foi feita com lâmina de bisturi. O orifício de trepanação foi realizado com uma broca (44,5mmX2mm) movida por micromotor (LB100 – Beltec) (Michailowsky et al., 2003) na topografia do osso parietal direito a 3mm da linha média (sutura sagital) e 3mm posterior à sutura coronal a 4mm de profundidade. Os animais infectados foram inoculados intracranialmente com 3 a 5 cisticercos em estágio inicial (Vinaud et al., 2008) em seguida, o orifício de trepanação foi fechado com massa plástica estéril e a incisão suturada.

Retirada dos encéfalos para análise. Aos 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,1ml/10g da solução de Xilazina a 2%

e Cetamina a 10%. Posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, para a coleta do encéfalo para posterior análise.

Análise Histopatológica. A análise histopatológica foi realizada com fragmentos de encéfalos fixados em formoldeído a 10% tamponado, desidratados em álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e confeccionados blocos. Em seguida foram confeccionados em microtomia, cortes de 5 µm de espessura. Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro e posteriormente, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) ou outras técnicas histoquímicas quando necessário, tais como; picro-sírius, para a identificação de fibrose; ácido periódico de Schiff (PAS), para depósito de radicais glicídicos; von Kossa, para depósito de sais de cálcio e vermelho Congo para beta-fibrilose (Lino-Jr et al., 2002).

Quantificação de cisticercos e classificação em etapas de desenvolvimento. Por meio da microscopia descreveu-se a localização anatômica dos cisticercos e classificou-se de acordo com a fase de desenvolvimento em inicial, larval e final de acordo com Vinaud et al (2008).

Análise dos Processos Patológicos Gerais. Os processos patológicos gerais foram analisados no parasito, na interface parasito-hospedeiro e no tecido do hospedeiro observando: 1) alterações da célula; 2) alterações do interstício; 3) alterações locais da circulação sangüínea; 4) pigmentações patológicas; 5) calcificação patológica; 6) edema; 7) inflamação; e 8) distúrbios no crescimento e diferenciação celular. Os processos patológicos descritos foram classificados de forma semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta com comprometimento de até 25% da área, moderada de 26 a 50% e acentuada acima de 50% de comprometimento (Lino-Jr et al., 2002).

Análise Estatística. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição não normal, as variáveis foram analisadas pelo teste não paramétrico de Manh-Witney. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

Macroscopia, estágio de desenvolvimento e localização dos cisticercos

A partir dos 30 DAI, constatou-se hiperemia, diminuição da consistência do encéfalo e presença de cisticerco no interior dos ventrículos, na maioria dos casos, associados à ventriculomegalia, hipotrofia do parênquima cerebral adjacente e/ou desvio das estruturas da

linha média. Essas alterações patológicas foram mais acentuadas nos animais convencionais à partir dos 30 DAI (Figura 7).

Dos 40 animais infectados, 60% (n=24) apresentaram cisticercos no encéfalo. O acometimento dos camundongos BALB/c selvagens foi de 20% (n=4) enquanto que nos animais KO-IL-4 foi de 100% (n=20). Nos animais KO-IL-4 encontrou-se maior parasitismo uma vez que 25% (n=5) apresentaram mais de um cisticerco. Nos convencionais e KO-IL-4 observou-se cisticercos em estágio final, ou seja, destruídos somente aos 90 DAI (Tabela 4). Discretas áreas de fibrose na região subependimária foram observadas nos animais convencionais aos 90 DAI e em todos os cisticercos em estágio final de desenvolvimento. Constatou-se uma diminuição dos depósitos de glicogênio no interior dos cisticercos à medida que os mesmos foram sendo destruídos (Tabela 4).

Reações na interface parasito-hospedeiro e no tecido do hospedeiro

Tanto nos animais convencionais quanto nos KO-IL-4 aos 7 DAI, foram observadas alterações discretas como: microgliose, edema, hiperemia, ependimite e ventriculomegalia (Figura 8-A e B). Nos camundongos BALB/c aos 30 DAI, observou-se um maior infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro e gliose (Figura 8-C e D, Tabela 5). Aos 30 DAI não ocorreu diferença entre as linhagens quanto à hiperemia, edema, meningite, microgliose e ependimite. A ausência da IL-4 induziu menor intensidade no infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares e edema intraparenquimatoso, por outro lado, apresentou ventriculomegalia (Tabela 5).

Nos KO-IL-4 aos 60 DAI observou-se ventriculomegalia, meningite e infiltrado inflamatório tanto na interface parasito-hospedeiro, quanto no tecido do hospedeiro foram menores em comparação aos convencionais (Figura 9-A e B, Tabela 5). Além disso, a ausência da IL-4 favoreceu uma maior sobrevivência dos cisticercos, uma vez que estes foram observados predominantemente em estágio larval.

Aos 90 DAI a ausência da IL-4 manteve a intensidade do infiltrado inflamatório menor tanto na interface quanto no tecido do hospedeiro, bem como na ependimite (Tabela 5). A sobrevivência e viabilidade dos cisticercos continuaram favorecidas pela ausência da IL-4 (Figura 9-C e D).

Em todos os animais controle de ambas as linhagens foram observadas uma discreta hiperemia e edema na fase inicial da infecção.

Discussão

O presente trabalho avaliou o papel da IL-4 na NCC experimental fazendo uma análise anatomopatológica das lesões para compreensão dos processos inflamatórios envolvidos. Por ser a IL-4 a principal citocina da resposta imune do tipo 2, possuindo ação indutora e efetora nas células Th2 e estimular a troca de isótipo de anticorpos nas células B para a produção de IgE, utilizou-se camundongos desprovidos do gene para IL-4. Além de possuir uma ação supressora sobre as funções do IFN- γ sobre os macrófagos exercendo uma inibição sobre a atividade dessas células. Para essa investigação, foi empregada uma técnica experimental adaptada de Michailowsky et al. (2003) e Alvarez et al. (2010), utilizando cisticercos de *T. crassiceps* por apresentarem grande similaridade antigênica com os cisticercos de *T. solium* (Vaz et al. 1997).

Todos os animais infectados apresentaram alterações macro e microscópicas, mesmo que discretas inclusive nos animais BALB/c de 07 e 30 DAI que não apresentaram cisticercos na análise microscópica. Como em todos os grupos que apresentaram cisticercos no encéfalo, estes em sua maioria estavam localizados no interior dos ventrículos laterais (Tabela 5), a resposta inflamatória não se tornou intensa. Fato observado na literatura, que descreve não haver a necessidade da presença de cistos intraventriculares para o desenvolvimento de alterações como ventriculomegalia, bastando à presença de antígenos circulantes do parasito e mesmo quando presentes nas cavidades ventriculares não apresentam uma resposta inflamatória exarcebada (Garcia et al. 2002). Não foram observadas áreas de calcificações tanto nos cisticercos quanto no tecido do hospedeiro, o que Cuether et al (1997) e Lino-JR et al (2002) já haviam constatado ao estudar NCC intraventricular em humanos. A diminuição gradativa de depósitos de glicogênio no interior dos cisticercos está em acordo com os dados encontrados na literatura em seres humanos (Lino-Jr et al., 2002).

Foi constatado que o cisticerco em estágio inicial apresentava discreto processo inflamatório ao seu redor e, somente com a perda na capacidade de modular a resposta inflamatória (morte do parasito ou estágio final), o processo se intensificava com presença de discreta fibrose. Segundo Alvarez et al. (2010), o cisticerco possui uma capacidade intrínseca de imunomodulação através de glicoproteínas presentes na superfície de seu tegumento, capaz de mantê-lo viável e dessa forma, sendo comum nas análises histológicas de cérebros de indivíduos assintomáticos observar parasitos encistados viáveis com pouca ou nenhuma evidência de inflamação ao seu redor, colaborando para que essa inflamação se torne crônica. Além da imunomodulação, os cisticercos utilizam outros mecanismos para enganar o sistema

imune do hospedeiro, como a própria resposta imune. Flisser et al (1991) analisando cistos obtidos de cérebros infectados com cisticercos demonstraram IgG, IgM, IgA e IgE do hospedeiro na superfície e fluído, sugerindo que os parasitos sobrevivam recobrando-se de imunoglobulinas do hospedeiro, provavelmente através de receptores Fc presentes na superfície de seu tegumento.

Observou-se que os animais BALB/c convencionais apresentavam evolução crescente no processo inflamatório tanto na interface, quanto no tecido do hospedeiro, ocorrendo destruição parcial dos cisticercos aos 60 DAI. Nos animais IL4-KO, a evolução do processo inflamatório não foi resolutive, uma vez que, durante todo o período experimental ainda encontraram-se cisticercos viáveis, não controlando de forma eficaz a infecção. Observações realizadas em outros modelos experimentais demonstram que uma resposta imunológica do tipo 1 ocorre enquanto o parasito está intacto e uma mistura dos tipos 1 e 2 quando o parasito começa a ser destruído (Rodriguez-Sosa et al. 2004). Esses achados sustentam a opinião que os parasitos mantêm o equilíbrio com a resposta imune do hospedeiro no início da infecção, assim, uma rápida resposta do tipo 1 com produção de IgG é desencadeada, mas com o passar do tempo este equilíbrio é modificado para uma resposta do tipo 1 e 2 que podem resultar na destruição dos cisticercos (Del Brutto et al. 2005). Nos casos de NCC humana, encontram-se em pacientes assintomáticos e sintomáticos padrões de resposta imune-inflamatório característicos. Onde em pacientes assintomáticos as concentrações de IL-4, IL-5 e IL-13 no sobrenadante de células mononucleares coletadas e estimuladas *in vitro*, encontravam-se aumentadas, o que caracterizaria um perfil do tipo 2 (Chavarria et al. 2003). Relacionando o perfil do tipo 2 desses pacientes com a resolução da NCC, enquanto que o perfil do tipo 1 está relacionado a resposta imune celular maior no parasito como no modelo experimental de NCC causado pelo *Mesocostoides corti*. Neste caso, observou-se maior destruição do parasito e predomínio desse perfil imunológico (Cardona et al. 1999). Todos os controles apresentaram discreto edema e hiperemia resultantes do trauma mecânico na fase inicial provavelmente provocado pelo procedimento de inoculação.

De acordo com as análises anatomopatológicas bem como do processo inflamatório nos encéfalos dos animais, conclui-se que a ausência da IL-4 induza uma menor intensidade no infiltrado inflamatório, menor ventriculomegalia e perivascularite.

Agradecimentos

A toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental do IPTSP/UFG e ao incentivo e apoio financeiro do CNPq.

Referências

Agapejev S. 2003. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil: análise crítica. *Arq Neuropsiquiatr* 61:822-828.

Agapejev S. et al. 2007. Aspectos clínicos e evolutivos da hidrocefalia na neurocisticercose. *Arq Neuropsiquiatr* 65(3-A):674-680.

Alvarez JI, and Teale JM 2006. Breakdown of the blood brain barrier and bloodcerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *J Neuroimmunol* 173: 45–55.

Alvarez, J. I. and Teale, J. M. 2007. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 187: 102–113.

Alvarez, J. I., Rivera, J. and Teale, J. M. 2008. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Alvarez, J.I., Mishra, B.B., Gundra U.M., Mishra, P.K., Teale, J.M. 2010 *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 137: 359-372.

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

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

Cardona, A.E.; Gonzalez, P.A.; Teale, J.M. 2003 CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma delta T cells in amplification of the host immune response. *Infect. Immun.* 71: 2634-2642.

CETEA-UFMG 2008. Protocolos Anestésicos. Disponível em <<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea>> Acesso em: 07/06/2010.

Chavarria A, Roger B, Fragoso G. 2003. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection* 5: 1109–1115.

Cuetter, A.C.; Garcia-Bodadilha, Guerra, J. L.G.; Martinez, F.M.; Kaim, B. 1997 Neurocysticercosis: Focus on Intraventricular Disease. *Clinical Infectious Diseases* 24:157-64

Del Brutto O H, Santibanez R, Idrovo L, Rodriguez S, Diaz-Calderon E, Navas C, Gilman R H, Cuesta F, Mosquera A, Gonzalez A E, Tsang V C and Garcia H H 2005 Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador; *Epilepsia* 46: 583–587.

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

Fragoso, G.; Lamoyi , E.; Mellor, A.; Lomeli, C.; Hernandez, M.; Sciutto, E.1998. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa-2 Transgenic Mice. *Infection And Immunity* 66 (2): 760-764.

Garcia, H.H; Gonzalez, A.E.; Gilman, R.H 2002. Cysticercosis Working Group in Peru. Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 66:427-430.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52: 575-580.

Lino-Jr, R. S., Ribeiro, P. M., Antonelli, E. J., Faleiros A. C., Terra, S. A., Reis, M. A. e Teixeira, V. P. A. 2002. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 617-622.

Maizels, R.M.; Yazdanbakhsh, M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 733-744.

Michailowsky, C. 2003. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. *Arq. Neuro-Psiquiatr* 61, n. 2A.

MMWR 1992. *Morbidity And Mortality Weekly Report*, v.41, n.37, p.691-699.

Prasad, K. N., Prasad A., Gupta, R. K., Nath K., Pradhan, S., Tripathi, M. and Pandey, C. M 2008 Neurocysticercosis in Patients with Active Epilepsy From a Pig Farming Community; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi: 10.1016/j.trstmh.2008.07.015

Terrazas, L.I.; Bojalil, R.; Govezensky, T.; Larralde, C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J.Parasitol* 8:74-81.

Terrazas, I.L 2008. The Complex role of pro- and Anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: Immunological Lessons from Experimental and Natural Hosts *Curr Top Med Chem* 8: 383-392.

Vaz, A. J. C. M. Nunes, R. M. Piazza, J. A. Livramento, M. V. Da Silva, P. M. Nakamura e A. W. Ferreira 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57, n.3: 354-7.

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

Vinaud, M.C.; Ferreira, C.S.; Lino Jr., R.S.; Bezerra, J.C.B. 2008. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology* 120: 221-226.

White Jr, A.C.; Serpa, J.A.; Graviss, E. A.; Kass, J. S. 2011. Neurocysticercosis in Houston, Texas An Update. *Medicine* 90: 81-86.

WHO. 2010 http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/ acessado em 20/05/2011.



Figura 7: Mesoscopia de encéfalos de BALB/c convencional (A) e desprovido do gene de IL-4 (B) mostrando ventriculomegalia e desvio da linha média. Na figura B observamos a presença de cisticerco (seta) no interior da cavidade ventricular (Escala = 1mm).



Figura 8: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c convencionais e IL4 – KO. Aos 7 DAI, os animais convencionais (A) observou-se lesões nas paredes do ventrículo (seta); nos KO-IL-4 (B) obsevou-se perivascularite (cabeça de seta) e discreto infiltrado inflitrado inflamatório (seta). Aos 30 DAI, os animais convencionais apresentavam lesões mais acentuadas com presença de cristais de colesterol na região ependimária (seta) e os KO-IL-4 cisticercos em estágio larval de desenvolvimento (seta) e discreto infiltrado inflamatório (HE, escala = 100µm).

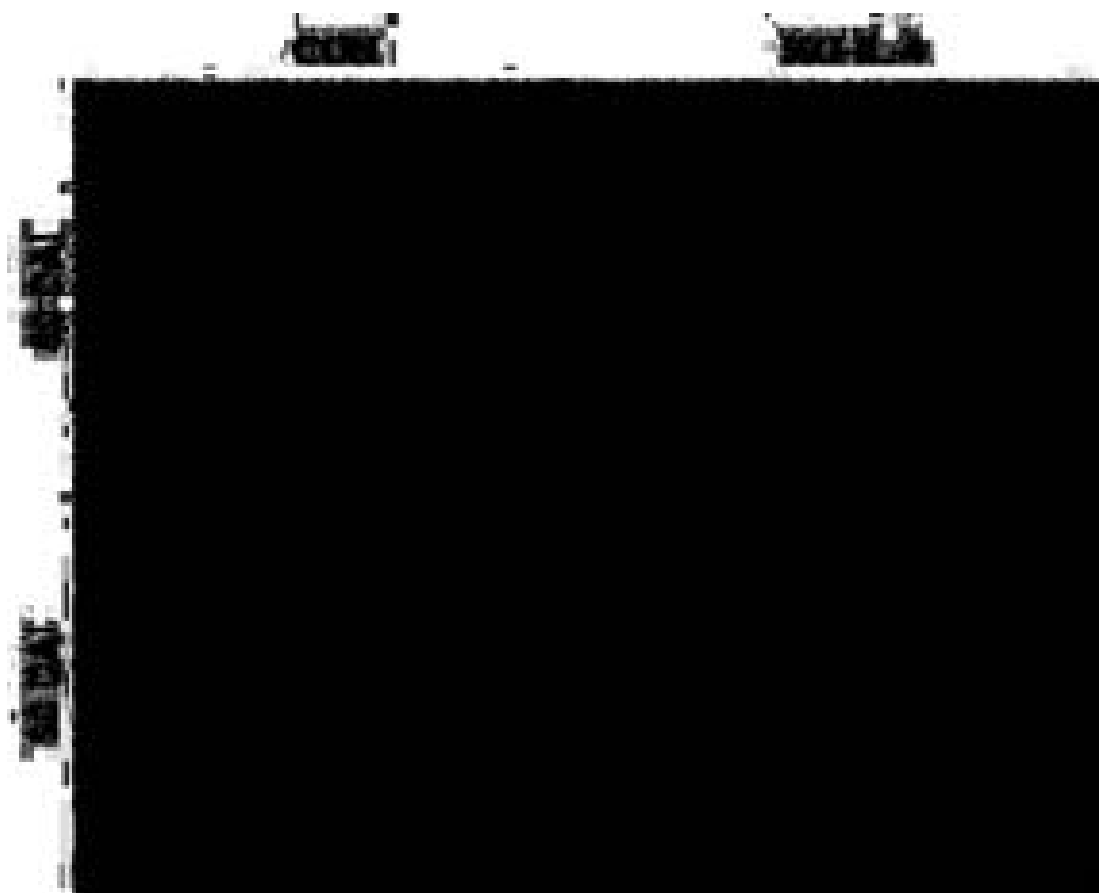


Figura 9: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c convencionais e IL4 – KO. Aos 60 DAI, observou-se nos animais convencionais (A) cisticerco em estágio larval de desenvolvimento (seta) com infiltrado inflamatório perivascular (cabeça de seta) próximo ao parasito, nos KO-IL-4 (B) o cisticerco observado também encontrava-se em estágio larval (seta) e infiltrado inflamatório (cabeça de seta). Aos 90 DAI, os convencionais (C) apresentavam cisticerco em estágio final (seta) , sendo constatada a presença de cisticerco em estágio final (cabeça de seta) nos KO-IL-4 (D) (HE, barra = 100µm).

Tabela 4: Processos patológicos encontrados nos parasitos em camundongos BALB/c convencionais e desprovidos do gene da IL-4 submetidos à infecção experimental por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Estádio	-	-	LAR	FIN	INI	LAR	LAR	LAR/FIN
Localização	VL	VL	VL	VL	VL/3°V	VL	VL	VL
I.I.(MN, PMN)	-	-	++	++	+	+	+	+
Calcificação	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	-	-	-	+	-	-	-	+
D.glicogênio	-	-	++	+	+	++	++	+

Legenda: CON (Convencionais), KO (*Knockout*, BALB/c IL4-KO), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear), - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, VL (Ventrículo lateral), 3°V (terceiro ventrículo), LAR(Larval), FIN (Final), n=5 por dia experimental.

Tabela 5: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro em camundongos BALB/c convencionais desprovidos do gene para IL-4 e submetidos à infecção experimental por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Ventriculomegalia	+	+	++	+++	+	++	++	+++
Hiperemia	+	+	++	+	+	++	++	+++
I.Inf. - MN	+	+	++	++	+	++	++	++
I.Inf. - PMN	+	++	++	+++	+	++	++	++
Perivasculite	+	++	++	+++	++	+	+	++

Legenda: CON (Convencionais), KO (knockout, BALB/c IL4-KO), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear, - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, n=5 por dia experimental.

Tabela 6: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro em camundongos BALB/c convencionais desprovidos do gene para IL-4 submetidos à infecção experimental por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Calcificação	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	-	-	-	+	-	-	-	+
Depósito de glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-
Microgliose	+	+	+	+	+	+	+	+
Meningite	+	+	++	++	+	+	+	+
Gliose	+	++	+	+	+	++	++	+
Edema	+	++	+	+	+	+	+	+
Hiperemia	+	+	+	+	+	+	+	+
Ependimite	+	+	+	++	+	+	+	+
Perivascularite	+	++	++	+++	+	++	++	++
I.Inf.– MN	+	+	++	++	++	++	+	++
I.Inf.– PMN	+	++	++	+++	++	++	+	++

Legenda: CON (Convencionais), KO (knockout, BALB/c IL4-KO), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear, - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, n=5 por dia experimental.

Manuscrito 3

“IFN γ INDUZ MAIOR DESTRUIÇÃO DOS CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* INTRAVENTRICULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6.”

Hidelberto Matos Silva^{1,3}, Bruno Pereira Reciputti¹, Élbio Cândido de Paula², André Luiz Oliveira¹, Vânia Beatriz Lopes¹, Patrícia Nagib Loyola¹, Marina Clare Vinaud¹, Milton Adriano Pelli Oliveira¹, Ruy de Souza Lino Júnior¹.

1. *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go, Brasil.*
2. *Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás.*
3. *Centro Universitário UNIRG, Gurupi-TO, Brasil.*

Palavras chave: *neurocisticercose, Taenia crassiceps, inflamação , C57BL/6.*

Artigo a ser submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Abstract

Responsible for over than 50 thousand annual deaths neurocysticercosis (NCC) is one of the main parasitosis of the central nervous system (CNS) and the main cause of active epilepsy in patients with neurologic clinics in development countries such as Mexico and Brazil. Studies demonstrate that C57BL/6 mice are more resistant to experimental intraperitoneal infection with *Taenia crassiceps* cysticerci as they present a predominance of type 1 immune response. This study aimed the evaluation of IFN γ role in the inflammatory response of conventional C57BL/6 mice and C57BL/6 mice lacking IFN γ gene (KO- IFN γ) inoculated via intracranial with *T. crassiceps* cysticerci. Those mice were inoculated via intracranial with cysticerci and euthanized at 7, 30, 60 and 90 days after the infection (DAI) and had their brains removed and histopathologically analyzed. In conventional animals the presence of IFN γ induced ventriculomegaly with greater intensity due to the chronification of the inflammatory response which was more intense with greater microgliosis and precocious destruction of the cysticerci. While in the KO-IFN γ animals the inflammatory response was less intense with prevalence of polymorphonuclear cells. The increase in the mononuclear cells occurred only at 90 DAI when the destruction of the parasites occurred. In conclusion, this results show that IFN γ plays a fundamental role in the stimulus of the inflammatory response against the intraventricular *T. crassiceps* cysticerci and stimulates the microglia cells and the intensity of the inflammatory response in the host which induces the precocious destruction of the parasite.

Resumo

Responsável por mais de 50 mil mortes anuais, a Neurocisticercose (NCC) é uma das principais parasitoses do sistema nervoso central (SNC) e a principal causa de epilepsia ativa em pacientes de clínicas neurológicas em países em desenvolvimento, como México e Brasil. Estudos demonstram que os camundongos C57BL/6 são mais resistentes à infecção experimental intraperitoneal por cisticercos de *Taenia crassiceps* por apresentarem uma resposta predominantemente do tipo 1. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do IFN γ na resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ (KO- IFN γ) inoculados intracranialmente com cisticercos de *T. crassiceps*. Camundongos C57BL/6 e KO- IFN γ foram inoculados intracranialmente com cisticercos e eutanasiados aos 7, 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI), para a retirada dos encéfalos e análise histopatológica. Nos animais convencionais a presença do IFN γ induziu ventriculomegalia com maior intensidade, devido a cronificação da resposta inflamatória tornando-a mais intensa, maior microgliose e destruição precoce dos cisticercos. Enquanto que nos animais KO-IFN γ , a resposta inflamatória foi menos intensa com o predomínio de polimorfonucleares, ocorrendo o aumento de mononucleares aos 90 DAI, só então destruindo os cisticercos. Em conclusão, os resultados mostraram que o IFN γ exerce um papel fundamental no estímulo da resposta inflamatória contra os cisticercos intraventriculares de *T. crassiceps*, estimulando as células da micróglia e a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro, provocando destruição mais precoce dos parasitos.

Introdução

Responsável por mais de 50 mil mortes anuais (WHO 2010) a Neurocisticercose (NCC) é uma das principais parasitoses do sistema nervoso central (SNC), considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma doença negligenciada em muitos países desenvolvidos (Flisser et al. 1991; Agapejev et al. 2003).

A NCC é identificada como a principal causa de epilepsia ativa em pacientes de clínicas neurológicas em países em desenvolvimento, como o México e Brasil (Del Brutto et al., 2005). A doença é responsável por até 2% das admissões neurológicas e neurocirúrgicas no Sul da Califórnia e mais de 100 casos anuais nos Estados Unidos (Prasad et al. 2008). Schenone et al. (1982) relataram a existência da NCC na América Latina em 18 países, com uma estimativa de 350 mil pacientes.

A resposta imune inicial no modelo experimental murino da NCC utilizando *Mesocestoides corti* é do tipo 1 (Cardona et al. 1999), porém ela não resolve completamente a infecção, possivelmente devido às estratégias de evasão do parasito (Alvarez et al. 2008). Na NCC murina, baixas quantidades de parasitos são hábeis em promover uma resposta inicial do tipo 1, capaz de eliminar patógenos (Alvarez et al. 2010). No modelo murino ocorre acúmulo de parasitos e células inflamatórias em áreas extraparenquimatosas do encéfalo, como nos ventrículos, meninges e espaço subaracnóideo iniciando de 1-3 dias após a infecção (Cardona et al. 1999). Com o progresso da infecção, parasitos e células imunes atingem o parênquima cerebral e a intensidade da inflamação aumenta, fato relacionado aos sintomas clínicos mais graves (Cardona et al. 1999; Sciutto et al. 2007). As citocinas produzidas pelas células infiltradas no SNC durante a infecção (IL-2, IL-12, IL-15, IFN γ e TNF- α) indicam uma resposta do tipo 1, mediada por células. A produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-4 (do tipo 2) e IL-10 (reguladora) são detectadas em baixos níveis (Cardona et al. 1999).

Poucos são os estudos com modelos experimentais de NCC, o mais estudado utiliza camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com *Mesocestoides corti* e foi desenvolvido pelo grupo de Cardona (1999). A partir deste trabalho alguns estudos sobre NCC experimental foram desenvolvidos para esclarecer o papel das células de defesa e das citocinas (Cardona et al. 1999, 2002, 2003), expressão e distribuição de receptores Toll-like, migração de leucócitos no sistema nervoso central (Ransohoff et al. 2003), estudo das proteínas do complexo juncional (Alvarez et al. 2007, 2008 e 2009) e estratégias de evasão imune (Alvarez et al. 2008). Algumas observações já foram feitas com a utilização desse modelo experimental, onde a resposta imune durante a infecção está associada com uma resposta

predominantemente do tipo 1, o que parece ocorrer direcionado pelos linfócitos $T\gamma\delta$ (gama-delta), que chegam ao local de infecção logo nos primeiros dias após a infecção e permanecem durante todo o curso, induzindo as células imunes a produzirem citocinas do tipo 1 (Terrazas et al. 2008).

De acordo com a literatura, camundongos C57BL/6 convencionais são mais resistentes à infecção experimental intraperitoneal por cisticercos de *T. crassiceps* por apresentarem uma resposta predominantemente do tipo 1 (Fragoso et al. 1998; Terrazas et al. 2008). Esse trabalho teve como objetivo, avaliar o papel do $IFN\gamma$ na resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene para $IFN\gamma$ infectados intracranialmente com cisticercos de *T. crassiceps*.

Materiais e métodos

Manutenção do ciclo. O ciclo biológico de *T. crassiceps* (cepa ORF) vem sendo mantido no biotério do IPTSP/UFG, a partir de camundongos BALB/c fêmeas infectadas com cisticercos desde 2002. Após 90 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e necropsiados para retirada de cisticercos em estágio inicial (Vinaud et al. 2008) que posteriormente foram inoculados na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas não infectadas (Vaz et al. 1997).

Animais. Utilizou-se camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de $IFN\gamma$ (KO- $IFN\gamma$) com 8 a 12 semanas de idade, pesando de 20 a 30 gramas, fornecidos e mantidos pelo Biotério do IPTSP-UFG. Para o experimento camundongos foram inoculados intracranialmente e distribuídos em quatro grupos contendo cinco camundongos por dia experimental, sendo eles: Grupo 1 – 20 camundongos convencionais infectados intracranialmente com cisticercos; Grupo 2 – 20 camundongos convencionais inoculados intracranialmente com solução salina; Grupo 3 – 20 camundongos KO- $IFN\gamma$ infectados intracranialmente com cisticercos; Grupo 4 – 20 camundongos KO- $IFN\gamma$ inoculados intracranialmente com solução salina. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação em Animais (CEEA/CEP-UFG), protocolo número 034/09.

Infecção experimental. Para a realização da inoculação, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com uma solução anestésica de Cetamina 100mg/ml e Xilazina 20mg/ml na proporção de 0,1ml/10g (CETEA-UFMG 2008, Alvarez et al. 2008). Após tricotomia da porção superior da cabeça seguida por antisepsia com iodo tópico, uma

incisão longitudinal e mediana na pele do crânio foi feita com lâmina de bisturi. O orifício de trepanação foi realizado com uma broca (44,5mmX2mm) movida por micromotor (LB100 – Beltec) (Michailowsky et al. 2003) na topografia do osso parietal direito a 3mm da linha média (sutura sagital) e 3mm posterior à sutura coronal a 4mm de profundidade. Os animais infectados foram inoculados intracranialmente com 3 a 5 cisticercos em estágio inicial (Vinaud et al. 2008) em seguida, o orifício de trepanação foi fechado com massa plástica estéril e a incisão suturada.

Retirada dos encéfalos para análise. Aos 7, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,1ml/10g da solução de Xilazina a 2% e Cetamina a 10%. Posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, para a coleta do encéfalo para posterior análise.

Análise Histopatológica. A análise histopatológica foi realizada com fragmentos de encéfalos fixados em formoldeído a 10% tamponado, desidratados em álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e confeccionados blocos. Em seguida foram confeccionados em microtomia, cortes de 5 µm de espessura. Os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro e posteriormente, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) ou outras técnicas histoquímicas quando necessário, tais como; picro-sírius, para a identificação de fibrose; ácido periódico de Schiff (PAS), para depósito de radicais glicídicos; von Kossa, para depósito de sais de cálcio e vermelho Congo para beta-fibrilose (Lino-Jr et al. 2002).

Quantificação de cisticercos e classificação em etapas de desenvolvimento. Por meio da microscopia descreveu-se a localização anatômica dos cisticercos e classificou-se de acordo com a fase de desenvolvimento em inicial, larval e final de acordo com Vinaud et al (2008).

Análise dos Processos Patológicos Gerais. Os processos patológicos gerais foram analisados no parasito, na interface parasito-hospedeiro e no tecido do hospedeiro observando: 1) alterações da célula; 2) alterações do interstício; 3) alterações locais da circulação sanguínea; 4) pigmentações patológicas; 5) calcificação patológica; 6) edema; 7) inflamação; e 8) distúrbios no crescimento e diferenciação celular. Os processos patológicos descritos foram classificados de forma semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta com comprometimento de até 25% da área, moderada de 26 a 50% e acentuada acima de 50% de comprometimento (Lino-Jr et al. 2002).

Análise Estatística. A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat 2.3. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Por apresentarem distribuição não normal, as variáveis foram analisadas pelo teste não

paramétrico de Manh-Witney. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

Análise Macroscópica

Constatou-se hiperemia, diminuição da consistência do encéfalo e presença de cisticerco no interior dos ventrículos, muitas vezes associada à ventriculomegalia, hipotrofia do parênquima cerebral adjacente e/ou desvio das estruturas da linha média. Com exceção a ventriculomegalia, mais intensa nos C57BL/6, as outras alterações patológicas foram mais acentuadas nos animais KO-IFN γ (Figura 10).

Classificação dos cisticercos e localização

Dos 40 animais infectados, foram observados cisticercos em 57,5% (n=23). O acometimento foi de 50% nos animais C57BL/6 convencionais e na ausência do IFN γ foi de 65% (n=13). Dos animais com cisticercos, 82,6% dos parasitos encontravam-se nos ventrículos laterais, o restante localizavam-se nos ventrículos dorsal, ventral e na região meningocortical (Figura 10). Foram observadas discretas áreas de fibrose no interior dos cisticercos em estágio final de ambas as linhagens, ao analisar os tecidos corados por Picrosirius e luz polarizada, além da diminuição dos depósitos de glicogênio do parasito à medida que eram destruídos, evidenciados pela coloração de PAS (Tabela 7).

Reações na interface parasito-hospedeiro e no tecido do hospedeiro

A análise anatomopatológica foi submetida a todos os animais do estudo, infectados e controle. Essa análise foi descrita e documentada para cada animal e posteriormente elaborada uma média que representasse cada grupo nos dias experimentais propostos (Tabela 8).

Nos animais convencionais com 7 DAI, observou-se um discreto infiltrado inflamatório ao redor do parasito sem comprometimento de sua membrana. Discreta gliose, edema, hiperemia, microgliose e ependimite (Figura 11-A) também foram observados. Nos animais KO- IFN γ não ocorreram meningite e microgliose. Na ausência do IFN γ o infiltrado inflamatório foi discreto (Figura 11-B) com o predomínio de polimorfonucleares próximos ao parasito, enquanto que nos C57BL6 houve predomínio de mononucleares (Tabela 8).

Aos 30 DAI a ausência do IFN γ continuou favorecendo um infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares e a presença de cisticercos viáveis em estágio larval (Figura 11-D), além de menor ventriculomegalia, hiperemia, edema, gliose e microgliose. Nos animais convencionais não foram observados parasitos destruídos, porém, o infiltrado era predominantemente de mononucleares (Figura 11-C).

Aos 60 DAI, observou-se nos animais KO- IFN γ menor microgliose e perivasculite, não ocorrendo a destruição dos cisticercos (Figura 12-B), e alteração no perfil de células inflamatórias (Tabela 8). Nos convencionais foram observados cisticercos em estágio final (Figura 12-A) com fibrose, necrose e infiltrado inflamatório de mononucleares (Tabela 7).

Com 90 DAI, a perivasculite manteve-se nos animais convencionais (Figura 12-C), a ventriculomegalia tornou-se acentuada e foi observada discreta área de fibrose no interior dos cisticercos e em algumas regiões subependimárias. Apenas nesse grupo foi observada discreta área de calcificação no parênquima (Tabela 9), na região do *putâmen caudal*. Na ausência do IFN γ houve uma maior inflamação nas meninges, destruição do parasito (Figura 12-D) e infiltrado com igual intensidade de polimorfonucleares e mononucleares. (Tabela 9).

Em todos os animais controle de ambas as linhagens foram observadas uma discreta hiperemia e edema na fase inicial da infecção.

DISCUSSÃO

Avaliando a influência das citocinas na resposta inflamatória do hospedeiro frente à uma infecção parasitária no SNC, utilizou-se cisticercos de *T. crassiceps*, por apresentarem similaridade antigênica com os cisticercos de *T. solium* (Alvarez et al. 2007). Inoculando intracranialmente esses parasitos, camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene para IFN γ foram utilizados para observar a influência dessa citocina no direcionamento da resposta inflamatória.

De acordo com os resultados do presente trabalho, na ausência do IFN γ observaram-se características de inflamação aguda até os 60 DAI e somente aos 90 DAI houve um equilíbrio no perfil de células. Enquanto que na linhagem convencional dos camundongos, a inflamação evoluiu da fase aguda para a crônica ao longo do período avaliado. Segundo a literatura, uma resposta do tipo 1 exerce um importante papel na resposta inflamatória da doença e eliminação do parasito, enquanto que a do tipo 2 parece estar mais envolvida na inibição de uma forte resposta inicial (Prasad et al. 2008), fato também observado neste

trabalho com os animais KO-IFN γ , onde pode-se notar um favorecimento de um perfil do tipo 2 e retardo na destruição do parasito, o que pode ter induzido a ativação alternativa de macrófagos através da ação da IL-4, diminuindo a intensidade da resposta inflamatória e direcionando para uma resposta mais antiinflamatória no tecido do hospedeiro de acordo com Terrazas et al.(2008).

A proliferação de células da micróglia, microgliose, foi visualizada de forma mais freqüente nos animais convencionais do que na ausência de IFN γ . As micróglia são células do sistema monofagocitário presentes em praticamente todo o parênquima cerebral e representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Na ausência de lesões, essas células possuem uma morfologia dendrítica com muitos processos altamente ramificados, caracterizada como micróglia de repouso (papel neurotrófico) (Polazzi & Contestabile, 2002; Streit, 2002) e após lesão parenquimal, receberiam estímulos, resultando na modificação em sua morfologia para uma forma amebóide semelhante aos macrófagos e aquisição de novas funções efetoras fagocíticas, apresentação de antígenos e indução da inflamação (Aloisi, 2001). Uma das citocinas envolvidas nessa conversão da micróglia é o IFN γ (Baker & Manuelidis, 2003).

No modelo experimental de NCC apresentado neste trabalho, 82,6% dos cisticercos visualizados encontravam-se no interior dos ventrículos e foi comum o achado de ventriculomegalia e distorção das estruturas da linha média. A cisticercose intraventricular tem sido documentada em vários trabalhos como uma forma da NCC humana em aproximadamente 16% dos casos de autópsia estudados (Pittella et al. 1997). Segundo Del Brutto et al (2005), nos casos de NCC humana extraparenquimatosa, a hipertensão intracraniana é a manifestação mais comum e pode ser devido ao efeito de massa, distorção da anatomia normal da circulação do líquido, obstrução direta do sistema ventricular pelo cisticercos ou reação inflamatória na meninge. Tais alterações foram observados nos animais com infecção intraventricular no presente estudo. A cisticercose intraventricular induz a uma menor resposta inflamatória, não apresenta calcificações e discreta meningite (Cuetter et al. 1997; Agapejev et al. 2007). Nos animais convencionais, aos 90 DAI, observou-se pequenas áreas de calcificação na região endimária, dados também encontrados na literatura em casos de NCC humana (Cuetter et al. 1997; Lino-Jr et al. 2002). modelo experimental com a doença em humanos. Além de maior ventriculomegalia que nos animais KO-IFN γ , provavelmente por possuírem uma resposta predominantemente inflamatória do tipo 1.

Na ausência do IFN γ a destruição do parasito ocorreu apenas aos 90 DAI, enquanto que nos animais convencionais essa destruição ocorreu de forma mais precoce aos 60 DAI. Além disso, os cisticercos em estágio inicial apresentaram discreto processo inflamatório provavelmente devido à sua capacidade de modular a resposta inflamatória, o processo se intensificava em ambas as linhagens. Segundo Alvarez et al. (2010), o cisticerco possui uma capacidade intrínseca de imunomodulação capaz de mantê-lo viável e dessa forma, é comum análises histológicas de cérebros de indivíduos assintomáticos, por autópsias, demonstrarem parasitos encistados viáveis com pouco ou nenhuma evidência de inflamação ao seu redor, colaborando para que essa inflamação se torne crônica. Também foram observados no estágio final desses parasitos, discretas áreas de fibrose e consumo dos depósitos de glicogênio, confirmando a total destruição dos cisticercos pela resposta inflamatória do hospedeiro.

Em conclusão, os resultados mostraram que a inflamação no encéfalo nos camundongos desprovidos do gene de IFN γ ocorreu um processo inflamatório com características da fase aguda marcada pelo predomínio dos polimorfonucleares e destruição parasitária tardia. Enquanto que nos animais convencionais a ação IFN γ na resposta inflamatória induziu destruição precoce do parasito.

Agradecimentos

A toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental do IPTSP/UFG e ao incentivo e apoio financeiro do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agapejev S. 2003. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil: análise crítica. *Arq Neuropsiquiatr* 61:822-828.

Agapejev S. et al. 2007. Aspectos clínicos e evolutivos da hidrocefalia na neurocisticercose. *Arq Neuropsiquiatr* 65(3-A) :674-680.

Aloisi, F.2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36:165–179.

Alvarez, J. I. and Teale, J. M. 2007. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 187: 102–113.

Alvarez, J. I., Rivera, J. and Teale, J. M. 2008. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Alvarez, J.I., Mishra, B.B., Gundra U.M., Mishra, P.K., Teale, J.M. 2010 *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 137: 359-372.

Baker, C. A., & Manuelidis, L.2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*100: 675–679.

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

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

Cardona, A.E.; Gonzalez, P.A.; Teale, J.M. 2003 CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma delta T cells in amplification of the host immune response. *Infect. Immun.*71: 2634-2642.

CETEA-UFMG 2008. Protocolos Anestésicos. Disponível em <<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea>> Acesso em: 07/06/2010.

Cuetter, A.C.; Garcia-Bodadilha, Guerra, J. L.G.; Martinez, F.M.; Kaim, B. 1997 Neurocysticercosis: Focus on Intraventricular Disease. *Clinical Infectious Diseases* 24:157-64

Del Brutto O H, Santibanez R, Idrovo L, Rodriguez S, Diaz-Calderon E, Navas C, Gilman R H, Cuesta F, Mosquera A, Gonzalez A E, Tsang V C and Garcia H H 2005 Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador; *Epilepsia* 46: 583–587.

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

Fragoso, G.; Lamoyi, E.; Mellor, A.; Lomeli, C.; Hernandez, M.; Sciutto, E. 1998. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa-2 Transgenic Mice. *Infection And Immunity* 66 (2): 760-764.

Lino Junior, R. S., Ribeiro, P. M., Antonelli, E. J., Faleiros A. C., Terra, S. A., Reis, M. A. e Teixeira, V. P. A. 2002. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 617-622.

Michailowsky, C. 2003. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. *Arq. Neuro-Psiquiatr* 61, n. 2A.

Pittella, J.E.H. 1997. Neurocysticercosis. *Brain Pathology* v.4: 681-693.

Polazzi, E., & Contestabile, A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Rev. Neurosci.* 13: 221–242.

Prasad, K. N., Prasad A., Gupta, R. K., Nath K., Pradhan, S., Tripathi, M. and Pandey, C. M 2008 Neurocysticercosis in Patients with Active Epilepsy From a Pig Farming Community; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi: 10.1016/j.trstmh.2008.07.015

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev., Immunol.* 3, 569–581.

Sciutto, E. et al 2007. The response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology*, 29: 621-636.

Schenone, H et al. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: *Flisser A et al, eds. Cysticercosis Present State of knowledge and Perspectives*, New York: Academic Press, 1982: 25-38.

Streit, W. G.2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133–139.

Terrazas, I.L 2008. The Complex role of pro- and Anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: Immunological Lessons from Experimental and Natural Hosts *Curr Top Med Chem* 8: 383-392.

Vaz, A. J. C. M. Nunes, R. M. Piazza, J. A. Livramento, M. V. Da Silva, P. M. Nakamura e A. W. Ferreira 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57, n.3: 354-7.

Vinaud, M.C.; Ferreira, C.S.; Lino Jr., R.S.; Bezerra, J.C.B. 2008. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology* 120: 221-226.

WHO. 2010 http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/ acessado em 20/05/2011.



Figura 10: Mesoscopia de encéfalo de camundongo C57BL/6 desprovido do gene para IFN γ aos 60 DAI. Presença de cisticerco meningocortical (seta) e alteração da morfologia encefálica devido a ventriculomegalia (cabeça de seta).



Figura 11: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene para $\text{IFN}\gamma$. Aos 7 DAI, observou-se nos animais convencionais (A) presença de cisticercos nos estádios inicial e larval (setas) e uma discreta área de ependimite (cabeça de seta); nos KO- $\text{IFN}\gamma$ (B) observou-se cisticerco em estágio inicial de desenvolvimento (seta). Com 30 DAI, foi possível observar nos convencionais (C) discreta meningite (seta); os KO- $\text{IFN}\gamma$ (D) apresentaram cisticercos em estágio inicial (setas) no interior do ventrículo lateral com infiltrado inflamatório (HE, barra = 100 μm).

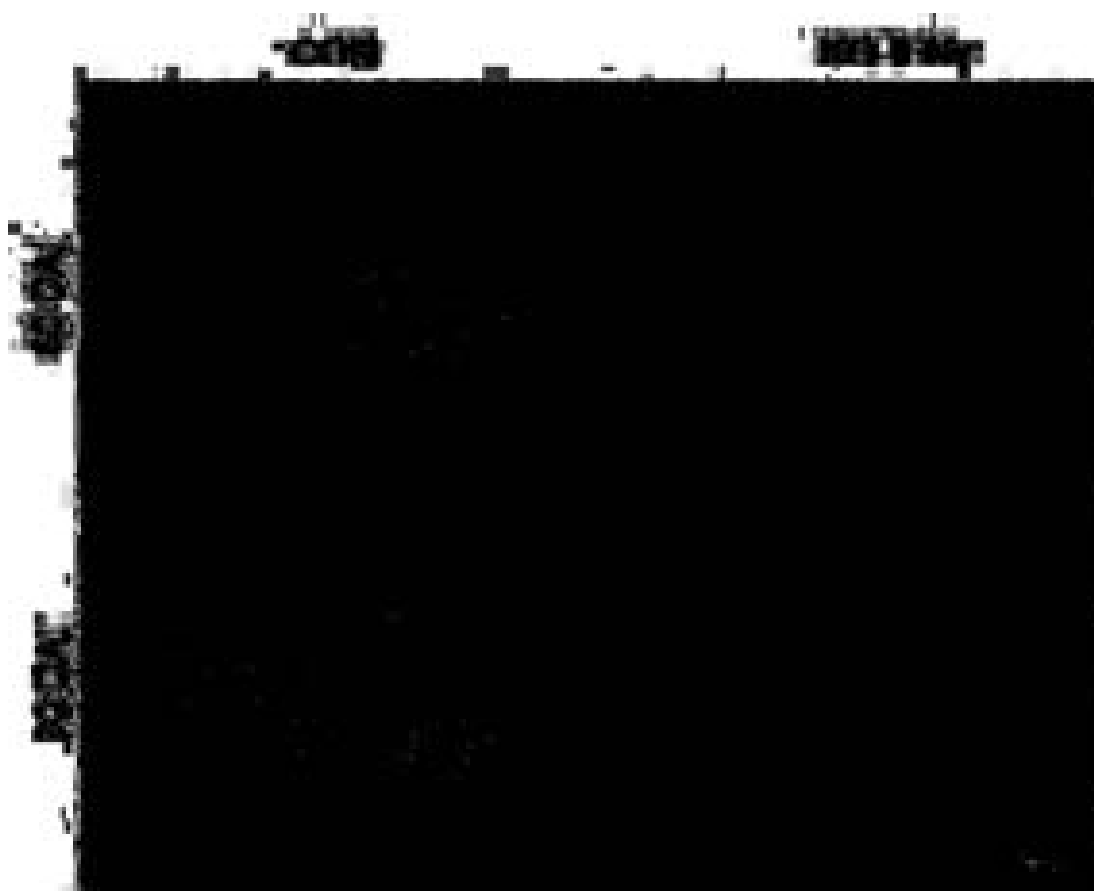


Figura 12: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene para IFN γ . Aos 60 DAI, nos camundongos convencionais (A) foi possível observar cisticerco em estágio final, ou seja, já destruído, (seta) com infiltrado inflamatório. Com 90 DAI, foi possível constatar nos animais convencionais (C) a continuidade de perivascularite moderada (seta); enquanto que nos animais KO-IFN γ (D), ocorreu a destruição do cisticerco, estágio final (seta) (HE, barra = 100 μ m).

Tabela 7: Processos patológicos encontrados no parasito de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO-IFN γ			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Estádio	INI/LAR	LAR	FIN	FIN	INI	INI	LAR	FIN
Localização	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL	VL
Calcificação	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrose	-	-	-	+	-	-	-	+
Depósito de glicogênio	+	++	+	+	+	+	++	+
I.I(MN,PMN)	+	+	++	++	-	+	+	++

Legenda: CON (camundongos C57BL/6 convencionais), KO-IFN γ (camundongos C57BL/6 desprovidos do gene para IFN γ), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear), - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, n=5 por dia experimental.

Tabela 8: Processos patológicos encontrados na interface parasito/hospedeiro de camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO-IFN γ			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Ventriculomegalia	+	++	++	+++	+	+	++	++
Hiperemia	+	++	++	++	+	+	+	++
Perivascularite	+	+	++	++	+	+	+	++
I.Inf.- MN	+	++	++	+++	+	+	+	++
I.Inf.- PMN	+	+	+	++	+	+	++	++

Legenda: CON (camundongos C57BL/6 convencionais), KO-IFN γ (camundongos C57BL/6 desprovidos do gene para IFN γ), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear), - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, n=5 por dia experimental.

Tabela 9: Processos patológicos encontrados no tecido do hospedeiro em camundongos C57BL/6 convencionais e desprovidos do gene de IFN γ submetidos à infecção intracranial por cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	CON				KO- IFN γ			
	07	30	60	90	07	30	60	90
	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Microgliose	+	+	+	+	-	-	-	+
Meningite	+	+	++	++	+	+	+	++
Gliose	+	+	+	+	-	-	+	+
Edema	+	+	+	++	-	+	+	+
Hiperemia	+	+	++	++	+	+	+	++
Ependimite	+	+	+	++	-	+	+	+
Perivascularite	+	++	++	++	+	+	++	++
I.Inf.- MN	+	++	++	+++	+	+	++	++
I.Inf.- PMN	+	+	+	+	+	+	++	++

Legenda: CON (camundongos C57BL/6 convencionais), KO- IFN γ (camundongos C57BL/6 desprovidos do gene para IFN γ), DAI (Dias de infecção), MN (Mononuclear), PMN (Polimorfonuclear), - ausente, + discreto, ++moderado, +++ acentuado, n=5 por dia experimental.

6. DISCUSSÃO

Ao utilizar modelos de infecção intraperitoneal com cisticercos de *Taenia crassiceps*, para comparar os resultados encontrados com o que ocorre na NCC na tentativa de entender a resposta inflamatória, pode-se perder características teciduais importantes ao desconsiderar a influência de proteínas e células presentes no SNC, como astrócitos, micróglia e pericitos (Brew et al. 2004). É fato que, a resposta inflamatória no SNC possui peculiaridades em sua ativação e finalização. A começar pela ausência de um sistema linfático que reabsorva o excesso de exsudato plasmático retidos nos tecidos e que são reabsorvidos por esse sistema em outros tecidos. No SNC, o líquido cefalorraquidiano faz o papel da linfa, e o seu excesso é reabsorvido pelas microvilosidades aracnóideas localizadas nos seios venosos. Outra diferença é a entrada das células inflamatórias no SNC, que é dificultada em condições normais, uma vez que esse sistema possui uma barreira natural que impede a entrada de moléculas e células formada pelas junções oclusivas das células do endotélio, a barreira hematoencefálica. Podendo circular em pequena quantidade como um sistema de vigilância através das três principais rotas de infiltração leucocitária (plexo coróide, espaço subaracnóideo e espaços perivasculares parenquimais). Em condições patológicas, a entrada de células inflamatórias aumentam por essas rotas e pela ruptura da barreira hematoencefálica. O controle da resposta inflamatória também é diferente no SNC, em estudos experimentais observou-se que na ausência de células $T\gamma\delta$ (gama-delta) ocorre uma menor inflamação no SNC. Essas células estimulam uma maior produção de citocinas do tipo 1, como o $IFN\gamma$, aumentando a resposta inflamatória local (Cardona et al. 1999). E quando se utiliza o modelo experimental de NCC com cisticercos de *Mesocostoides corti*, têm-se a perda da similaridade antigênica, como da *T. crassiceps* com a *T. solium*. Detalhes importantes no estudo da NCC murina e humana.

Na resposta inflamatória das infecções murinas com cisticercos de *T. crassiceps*, ocorre um predomínio inflamatório inicial de citocinas do tipo 1 resultando em maior destruição dos cisticercos e aumento de lesões, alterações teciduais e infiltrado inflamatório. Essas alterações se intensificam a medida que o parasito vai sendo destruído perdendo sua capacidade moduladora. A resposta imune inicial pode estar diminuída pela ação de glicoconjugados liberados do tegumento dos cisticercos, utilizados como mecanismo de evasão e modulação da resposta imune (Alvarez et al. 2008 e 2010). O acúmulo desses antígenos, que possuem uma natureza bioquímica complexa, no interior das células fagocitárias pode interferir nas vias intracelulares envolvidas com a apresentação de

antígenos pelas moléculas de histocompatibilidade, inibindo a ativação das células T (Alvarez et al. 2010). Além de se ligarem a moléculas de iniciação das vias do complemento, impedindo a sua ativação, bem como linfócitos e produção de citocinas (White et al. 1997).

Com o decorrer da resposta inflamatória e aumento na quantidade de células mononucleares, ocorreu a destruição completa dos cisticercos, fato observado nos camundongos C57BL/6 convencionais e na fase final da inflamação nas outras linhagens. Quando a resposta era predominantemente de polimorfonucleares, o crescimento dos cisticercos era favorecido e observava-se intensidades maiores de destruição dos tecidos adjacentes com ventriculomegalia e desvio da linha média. Além de gliose, fibrose, edema, meningite e perivascularite.

Ao analisar o papel da IL-4 observou-se que sua ausência favoreu a sobrevida dos cisticercos, diminuindo a intensidade da resposta inflamatória e acentuando a ventriculomegalia. A presença do IFN γ estimulou uma resposta inflamatória crônica com aumento da microgliose e destruição mais rápida e eficaz dos cisticercos.

7. CONCLUSÕES

As análises anatomopatológicas das quatro linhagens utilizadas de camundongos infectados pela técnica de inoculação intracranial desenvolvida neste trabalho, permitiu concluir que:

- I. O modelo experimental de NCC mostrou-se útil em reproduzir a doença nos animais infectados e sem alterações significativas para os controles, resultando em lesões;
- II. Os camundongos BALB/c também são menos resistentes que os C57BL/6 quando infectados intracranialmente, utilizando o modelo experimental de NCC com cisticercos de *T. crassiceps*, o que ocorre também no modelo intraperitoneal;
- III. Na ausência da IL-4, ocorreu uma diminuição na resposta inflamatória resultando na destruição dos cisticercos somente aos 90 DAI, porém, com menor ventriculomegalia e perivascularite;
- IV. O IFN γ exerceu um papel fundamental no direcionamento da resposta inflamatória intensificando-a contra cisticercos intraventriculares de *T. crassiceps*, estimulando as células da micróglia e provocando destruição mais precoce dos parasitos.
- V. A resposta inflamatória no SNC possui um controle maior da inflamação que outros tecidos.

8. REFERÊNCIAS

- Agapejev S. 2003. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil: análise crítica. *Arq Neuropsiquiatr* 61:822-828.
- Agapejev S. et al. 2007. Aspectos clínicos e evolutivos da hidrocefalia na neurocisticercose. *Arq Neuropsiquiatr* 65(3-A):674-680.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
- Aloisi, F.2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36:165–179.
- Alvarez JI, and Teale JM 2006. Breakdown of the blood brain barrier and bloodcerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *J Neuroimmunol* 173: 45–55.
- Alvarez, J. I. and Teale, J. M. 2007. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 187: 102–113.
- Alvarez, J. I., Rivera, J. and Teale, J. M. 2008. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Alvarez, J.I., Mishra, B.B., Gundra U.M., Mishra, P.K., Teale, J.M. 2010 *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 137: 359-372.
- Arocker ME, Huber SV, Auer H, Grabner G, Stur M 1992. Taenia crassiceps in the anterior chamber of the human eye. A case report. *Klin Monatsbl Augenheikd* 201:34-37.
- Baker, C. A., & Manuelidis, L.2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*100: 675–679.

- Ballek D, Takla M, Ising-Volmer S, Stoye M 1992. The Helminth fauna of red foxes (*Vulpes Vulpes* Linnaeus 1758) in north Hesse and east Westphalia. 1. Cestodes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 99: 362-365
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40: 845–859.
- Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessary. *Nat Rev Immunol* 7: 875-888.
- Brasileiro Filho, G. 2009. Patologia do interstício. In Patologia Geral – Bogliolo. 4ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Brew, B. J. and Guillemin, G. 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 388-397.
- Brojer CM, Peregrine AS, Barker IK, Carreno RA, Post C 2002. Cerebral cysticercosis in a Woodchuck (*Marmota monax*). *J Wildl Dis.* 38 :621-624. 12. Bueno EC, Machado RL, Livramento JA, Vaz AJ 2004. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and noninflammatory phases). *Act Trop* 91: 205-213.
- Bueno EC, Machado RL, Livramento JA, Vaz AJ 2004. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and noninflammatory phases). *Act Trop* 91: 205-213.
- Cardona, A.E.; Restrepo, B.I.; Jaramillo, J.M.; Teale, J.M. 1999. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J. Immunol* 162: 995-1002.
- Cardona, A.E.; Teale, J.M 2002. Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *J. Immunol* 169: 3163-3171.

Cardona, A.E.; Gonzalez, P.A.; Teale, J.M. 2003 CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma delta T cells in amplification of the host immune response. *Infect. Immun.* 71: 2634-2642.

CDC –Center Diseases Control. 2011. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Taeniasis.htm>
Acesso em 006/06/2011.

CETEA-UFMG 2008. Protocolos Anestésicos. Disponível em
<<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea>> Acesso em: 07/06/2010.

Chavarria A, Roger B, Fragoso G. 2003. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection* 5: 1109–1115.

Chavarria, A. and Alcocer-Varela, J. (2004). Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity Reviews* 3, 251–260.

Dyer NW, Greve JH 1998. Severe *Cysticercus longicollis* in black lemur (*Eulemur macaco macaco*). *J Vet Diagn Invest* 10: 362-364.

Deblock S, Petavy AF 1983. Hepatic larvae of cestode parasites of vole rat *Arvicola terrestris* in Auvergne, France. *Ann Parasitol Hum Comp.* 58 :423-432.

Del Brutto OH, Sotelo J 1988. Neurocysticercosis: *An update. Reviews of Infect Diseases* 10: 1075-1087.

Del Brutto O H, Rajshekhar V, White A C Jr, Tsang V C, Nash T E, Takayanagui O M, Schantz P M, Evans C A, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan J C, Sarti E, Gonzalez A E, Gilman R H and Garcia H H 2001 Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis; *Neurology* 57 177–183.

Del Brutto O H, Santibanez R, Idrovo L, Rodriguez S, Diaz-Calderon E, Navas C, Gilman R H, Cuesta F, Mosquera A, Gonzalez A E, Tsang V C and Garcia H H 2005 Epilepsy and neurocysticercosis in Atahualpa: a door-to-door survey in rural coastal Ecuador; *Epilepsia* 46: 583–587.

Esch GW, Smyth JD 1976. Studies on the in vitro culture of *Taenia crassiceps*. *Internt. Journ. Paras* 6: 143-149.

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

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

Flisser, A. 2010. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. *Parasitology* 137, 347–357.

Fragoso, G.; Lamoyi , E.; Mellor, A.; Lomeli, C.; Hernandez, M.; Sciutto, E. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa-2 Transgenic Mice. *Infection And Immunity* 66 (2): 760-764.

Hoberg, E.P. 2002. *Taenia* tapeforms: Their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection* v4 (8): 859-866.

Nieto D. Historical notes on cysticercosis. In: Flisser A, Willms K., Laclette J.P., Larralde C., *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. New York: Academic Press, 1982. p 1-7.

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev., Immunol.* 3, 569–581.

Sciutto, E.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Montoya, R. M.; Diaz, M. L.; Govezensky, T.; Lomeli, C.; Tapia, G. and Larralde C. 1990. Cysticercosis vaccine: cross rotecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12:687–696.

François AMD, Favennec LPD, Cambon-Michot CMD, Gueit IMD, Biga Norman MD, Tron FMD, Ph.D BPMD, Ph.D Hemet JMD 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am J Surg Pathol* 22 :488-492

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

Garcia, H.H; Gonzalez, A.E.; Gilman, R.H 2002. Cysticercosis Working Group in Peru. Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 66:427-430.

Garcia HH, Gonzalez AE, Evans CA. 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362:547–556.

Garg, A.; Seth, R.; Suri, A.; Mishra, D. and Kalra, V. 2008. Intraventricular Neurocysticercosis. *Indian Journal of Pediatrics* 76: 420-423.

Gasparetto,E.L.; Eiras de Araújo, A.L.; Rodrigues, R.S.; Marchiori, E.; Pinheiro, R.A.; Flores, M.; Alves, J.R.D. 2008. Migrating intraventricular cysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66(1):111-113.

Heldwein K, Bierdermann HG, Hamperl WD, Bretzel G, Loscher T, Laregina D, Frosch M, Buttner DW, Tappe D 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg* 75: 108-111.

Kuhn, R. E.; Aldridge, J. R.; Johnson, E. C. 2010. Cpg stimulates protective immunity in Balb/Cj mice infected with Larval *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.*, 96(5), 2010, pp. 920–928

Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal* 420, 1–16.

Kunder, S. et al 2007. A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: Analysis of mouse

specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicologic Pathology* 35: 366-375.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52: 575-580.

Lino-Jr, R. S., Ribeiro, P. M., Antonelli, E. J., Faleiros A. C., Terra, S. A., Reis, M. A. e Teixeira, V. P. A. 2002. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 617-622.

Loos-Frank B, Zeyhle E 1982. The intestinal helminthes of red fox and some other carnivores in southwest Germany. *Z Parasitenkd* 67: 99-113.

Machado, A. B. B, Pialarissi, C. S. M. Vaz, A. J. 1988. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, vol.22, no.3.

Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Célerier P 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS* 12: 1551-1566.

Maizels, R.M.; Yazdanbakhsh, M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 733-744.

Marquéz-Monter H. Patologia de la cisticercosis. *Gaceta Medica de Mexico* 103:230-242, 1972.

Michailowsky, C. 2003. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. *Arq. Neuro-Psiquiatr* 61, n. 2A.

MMWR 1992. *Morbidity And Mortality Weekly Report*, v.41, n.37, p.691-699.

Pessoa, S. B., Martins, A. V. 1982 Ordem Cyclophyllidea-*Taenia solium* e cisticercose, *Taenia saginata*-Teníase-Gênero Multiceps In: PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia Médica* . 11ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p.433-464.

Papadopoulos H, Himonas C, Papazahariadou M, Antoniadou- Sotiriadou K 1997. Helminth of foxes and other wild carnivores from rural áreas in Greece. *J Helminthol* 71: 227-231.

Pfeiffer F, Kuschfeldt S, Stoye M 1997. Helminth fauna in red fox (*Vulpes Vulpes* LINNE 1758) in south Sachsen-Anhalt – 1. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 104: 445-448.

Pittella, J.E.H. 1997. Neurocysticercosis. *Brain Pathology* v.4: 681-693.

Polazzi, E., & Contestabile, A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Rev. Neurosci.* 13: 221–242.

Prasad, K. N., Prasad A., Gupta, R. K., Nath K., Pradhan, S., Tripathi, M. and Pandey, C. M 2008 Neurocysticercosis in Patients with Active Epilepsy From a Pig Farming Community; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi: 10.1016/j.trstmh.2008.07.015

Rodriguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I. 2002. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol*, v.168, n.7: 3135-9.

Restrepo B I, Liaguno P, Sandoval M A, Enciso J A and Teale J M 1998 Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th-1 like instead of Th-2; *J. Neuroimmunol.* 89 64–72.

Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM 2001. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69: 4554-4560.

Schenone, H et al. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. *In: Flisser A et al, eds. Cysticercosis Present State of knowledge and Perspectives, New York: Academic Press, 1982: 25-38.*

Shimalov VV., Shimalov, VT 2003. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res.*

Sciutto, E. et al 2007. The response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology*, 29: 621-636.

Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S. 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews* 67: 157-183.

Streit, W. G.2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133–139.

Takayanagui, O. M. e J. P. Leite. 2001 Neurocisticercose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.3: 283-290.

Terrazas, L.I.; Bojalil, R.; Govezensky, T.; Larralde, C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J.Parasitol* 8:74-81.

Terrazas, I.L 2008. The Complex role of pro- and Anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: Immunological Lessons from Experimental and Natural Hosts *Curr Top Med Chem* 8: 383-392.

Terrazas, I.L. 2010. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *International Journal for Parasitology* 40: 731–742.

Toenjes, S. A., R. J. Spolski, K. A. Mooney, and R. E. Kuhn. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 118:623–633.

Vaz, A. J. C. M. Nunes, R. M. Piazza, J. A. Livramento, M. V. Da Silva, P. M. Nakamura e A. W. Ferreira 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57, n.3: 354-7.

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

Vinaud MC 2007. *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*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 92pp.

Vinaud, M.C.; Ferreira, C.S.; Lino Jr., R.S.; Bezerra, J.C.B. 2008. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology* 120: 221-226.

Wei, H., Zou, H., Sheikh, A.M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., Li, X. 2011. IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *Journal of Neuroinflammation* (8): 52.

Wessbecher H, Dalchow W, Stoye M 1995. The Helminth fauna of red fox (*Vulpes Vulpes* LINNE 1758) in administrative district of Karlsruhe. 1. Cestodes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101: 322-326.

White A C, Robinson P and Khun R 1997 *Taenia solium* cysticercosis: host parasite interaction and the immune response; *Chem. Immunol.* **66** 209–230.

White Jr AC. 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annual Review of Medicine* 51:187-206.

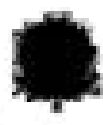
WHO. 2010 http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/ acessado em 20/05/2011.

Wunschmann A, Garlie V, Averbeck G, Kurtz H, Hoberg EP 2003. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in domestic cat. *Mol Biochem Parasitol* 167: 1-11.

9. ANEXOS



INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY
UNION INTERNATIONALE DE CHIMIE PURE ET APPLIQUEE
UNION INTERNACIONAL DE QUIMICA PURA Y APLICADA
UNION INTERNACIONAL DE QUIMICA PURA Y APLICADA



PROCEEDINGS

1958

THE 1958 MEETING OF THE UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY WAS HELD AT THE UNIVERSITY OF CHICAGO, CHICAGO, ILLINOIS, U.S.A., FROM 28 AUGUST TO 6 SEPTEMBER 1958. THE MEETING WAS ATTENDED BY 1,200 CHEMISTS FROM 45 COUNTRIES.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS CLOSED BY DR. J. N. BRINDLEY ON 6 SEPTEMBER 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

THE MEETING WAS OPENED BY THE PRESIDENT OF THE UNION, DR. J. N. BRINDLEY, ON 28 AUGUST 1958.

