

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Carlos Alexandre Aguiar Moreira

**O sexo é um fator determinante de diferenças
morfológicas e inflamatórias na neurocisticercose
extraparenquimatosa experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu para obtenção do título de Mestre
em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho

**Botucatu
2022**

Carlos Alexandre Aguiar Moreira

O sexo é um fator determinante de diferenças
morfológicas e inflamatórias na neurocisticercose
extraparenquimatosa experimental?

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu para obtenção do título de
Mestre em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho

Botucatu
2022

Dedicatória

Aos neurocirurgiões que me antecederam, aos meus contemporâneos
e aos que virão depois de mim.

Agradecimentos

Ao Prof. Pedro Tadao Hamamoto Filho, meu orientador, pela competência, dedicação e obstinação.

À Roseni, minha companheira e Isabela, minha filha pelo amor, apoio e compreensão incondicionais.

À minha mãe Iracema e ao meu pai Maurício (*in memoriam*), pela oportunidade da vida. Ao meu tio Édson (*in memoriam*) e ao meu padraсто Sebastião (*in memoriam*) pela assistência ao longo da vida.

Ao Prof. Luiz Antônio Araújo Dias, pelo convívio e ensinamentos, exemplo como médico, professor e neurocirurgião.

Aos professores Marco Antônio Zanini, Luiza da Silva Lopes, Rodrigo Bazan, José de Anchieta de Castro e Horta Junior, Selma Maria Michelin Matheus e Matheus Bertanha, pelas participações em bancas nas diversas etapas desse processo.

A Diego Generoso, Luis Henrique V. Murayama, Tatiane de Camargo Martins, Regina Moreto, Luis Etevalter Bardella, José Antônio Germiniano, Heraldo Catalan Rosa, e Khallil Taverna Chaim por colaborarem em diversas etapas da realização do trabalho.

Ao Prof. Alexandre Todorovic Fabro e Sabrina Setembre Batah, pela colaboração na análise histológica

Resumo

A neurocisticercose é a doença parasitária mais comum do sistema nervoso central. Ela é ocasionada por infestação cerebral pela larva de *Taenia solium*, que ocorre quando se ingerem ovos do parasita. O quadro clínico da doença é variável e está relacionado à carga parasitária, à localização dos cistos e à interação entre parasita e hospedeiro. Uma das diferenças mais marcantes da neurocisticercose é entre os sexos. Em geral, mulheres apresentam as formas mais graves da doença, o que sugere haver influência de hormônios sexuais na resistência ou suscetibilidade ao parasita. A hipótese é corroborada por estudos clínicos que demonstraram diferenças radiológicas e inflamatórias no líquido de pacientes com neurocisticercose. Em nível experimental, a diferença entre os sexos para a cisticercose está determinada a partir de estudos que basearam suas análises na inoculação de *Taenia crassiceps* na cavidade peritoneal de roedores. Fatores imuno-endocrinológicos estão envolvidos com a suscetibilidade à infecção pelo parasita. Por outro lado, nenhum estudo até o momento avaliou se há diferenças entre os sexos na neurocisticercose experimental, ou seja, na inoculação intracraniana de parasitas. Neste trabalho, analisamos se o sexo é um fator determinante de diferenças morfológicas e inflamatórias na neurocisticercose extraparenquimatosa experimental. Foram utilizados 76 ratos Wistar (42 fêmeas e 34 machos) pesando entre 150-200g. A inoculação foi feita com a punção do espaço subaracnóideo da cisterna magna na transição occípito-cervical e injeção de 50 cistos viáveis de *T. crassiceps*. Após três meses da inoculação, os animais foram submetidos a eutanásia e seus encéfalos submetidos a estudo histológico e imunoinzimático da expressão de IL6, IL-10 e IFN- γ . O estudo histológico evidenciou aumento significativo do número de linfócitos nos encéfalos de ratos fêmeas na região aracnoide e o estudo imunoinzimático mostrou níveis mais altos da citocina IL-6 no encéfalo de ratos do sexo feminino quando comparados aos encéfalos de ratos masculinos. Concluímos que houve diferença na resposta inflamatório entre os sexos, sendo a inflamação mais agressiva nos ratos fêmeas.

Palavras-chave: hidrocefalia; neurocisticercose; modelo experimental

Abstract

Neurocysticercosis is the most common parasitic disease of the central nervous system. It is caused by brain infestation by the larva of *Taenia solium*, which occurs when eggs of the parasite are ingested. The clinical picture of the disease is variable and is related to the parasite load, the location of the cysts and the interaction between the parasite and the host. One of the most striking differences in neurocysticercosis is between the sexes. In general, women have the most severe forms of the disease, which suggests an influence of sex hormones on resistance or susceptibility to the parasite. The hypothesis is supported by clinical studies that demonstrated radiological and inflammatory differences in the CSF of patients with neurocysticercosis. At the experimental level, the difference between the sexes for cysticercosis is determined from studies that based their analysis on the inoculation of *Taenia crassiceps* in the peritoneal cavity of rodents. Immuno-endocrinological factors are involved with the susceptibility to infection by the parasite. On the other hand, no study to date has evaluated whether there are differences between the sexes in experimental neurocysticercosis, that is, in intracranial inoculation of parasites. In this work, we analyze whether sex is a determinant of morphological and inflammatory differences in experimental extraparenchymal neurocysticercosis. 76 Wistar rats (42 females and 34 males) weighing between 150-200g were used. Inoculation was performed by puncturing the subarachnoid space of the cisterna magna at the occipito-cervical transition and injecting 50 viable *T. crassiceps* cysts. After three months of inoculation, the animals were euthanized and their brains were submitted to histological and enzyme-linked studies of IL6, IL-10 and IFN- γ expression. The histological study showed a significant increase in the number of lymphocytes in the brains of female rats in the arachnoid region and the enzyme-linked immunosorbent study showed a predominance of the cytokine IL-6 in the brains of female rats when compared to the brains of male rats. We concluded that there was a difference in the inflammatory response between the sexes, with inflammation being more aggressive in female rats.

Keywords: hydrocephalus; neurocysticercosis; experimental model

Abreviaturas e siglas

BALB/c - Camundongos isogênicos cepa albina

C57BL/6 - Camundongos isogênico preto

Células NK - Natural Killer

DHEA - Dehidroepiandrostenediona

FSH - hormônio folículo-estimulante (FSH)

G - Gauge

IFN- γ - Interferon-gama

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-18 - Interleucina 18

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-44 - Interleucina 44

IL-6 - Interleucina 6

Kg - Kilograma

LH - hormônio luteinizante

Mg - Miligrama

Ml - Mililitro

RNA_m - RNA mensageiro

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

Th0 - Linfócito T Helper

Th1 - Linfócito T Helper

Th2 - Linfócito T Helper

UNESP - Universidade Estadual Paulista

Sumário

Introdução.....	09
Justificativa.....	17
Objetivo.....	19
Métodos.....	21
Resultados.....	26
Discussão.....	32
Conclusão.....	38
Referências.....	40
Anexo – comprovante CEUA.....	47

Introdução

Introdução

A neurocisticercose é a doença parasitária mais comum do sistema nervoso central. Ela ocorre por infestação cerebral pela larva de *Taenia solium*, que acontece quando se ingerem ovos do parasita. A prevalência da doença diminuiu no final do século XX em razão de medidas sanitárias, porém persiste endêmica em diversas regiões da América Latina, África subsaariana e do Sudeste asiático. Fluxos migratórios têm determinado o surgimento de casos novos nos Estados Unidos e na Europa (Fabiano e Bruschi, 2013; Laranjo-González et al., 2017; Gripper e Welburn, 2017; Carpio et al., 2018).

A doença tem duas formas clínicas classicamente descritas: parenquimatosa e extraparenquimatosa. Na forma parenquimatosa, os cistos se alojam no interstício cerebral, onde podem manter, temporariamente, uma relação de equilíbrio com o hospedeiro através de estratégias de evasão da resposta imunológica, ou desencadear respostas inflamatórias exuberantes, determinando sintomas como crises epiléticas, cefaleia, déficits focais ou alterações cognitivas (Sotelo, 2011). Em muitos casos, a doença é assintomática e o diagnóstico é incidental quando o parasita já se degenerou, restando apenas calcificações no parênquima encefálico observadas em exames de neuroimagem (White-Jr et al., 2018; Fleury et al., 2006). Na forma extraparenquimatosa, os cistos se alojam nos compartimentos liquóricos (espaço subaracnóideo ou ventrículos cerebrais). A resposta inflamatória causada por cistos nesses compartimentos pode causar alterações do fluxo de líquido com consequente hidrocefalia e hipertensão intracraniana (Fleury et al., 2011; Bazan et al., 2016; Hamamoto Filho et al., 2021).

Muitos pacientes infectados por *T. solium*, não apresentam a doença, o que sugere haver variabilidade na suscetibilidade à doença (Sciutto et al., 2013). Entre os pacientes suscetíveis à doença, a gravidade dos sintomas também é variável: alguns são oligossintomáticos e outros podem ter quadros tão graves que evoluem para óbito, notadamente aqueles que desenvolvem reações inflamatórias extensas com hipertensão intracraniana associada. Portanto, o quadro clínico da doença é bastante variado e está relacionado à carga parasitária, à localização dos cistos e à interação entre parasita e hospedeiro (Fleury et al., 2016).

Outra diferença que tem chamado atenção na literatura recente é a heterogeneidade da doença em diferentes populações. Na América Latina, a forma extraparenquimatosa é frequente, porém a cisticercose em outras localizações do corpo (como intraorbitária ou intramuscular) são incomuns. Já na Ásia, cistos extraparenquimatosos são menos frequentes, proporcionalmente

há muitos cistos cerebrais isolados, e muitos casos de cisticercose muscular. Essas diferenças parecem relacionadas à variabilidade genética das populações geograficamente distantes e também do próprio parasita além de diferenças na apresentação da infecção (Singh et al., 1997; Rajshekhar et al., 2000; Cárdenas et al., 2016; Hamamoto Filho et al., 2020).

Também há heterogeneidade na resposta ao tratamento clínico: albendazol e praziquantel são drogas antiparasitárias com comprovada eficácia, e seu uso está bem estabelecido em diretrizes de tratamento apoiadas em evidências científicas (White-Jr et al., 2018). Porém, frequentemente se observam pacientes refratários ao tratamento clínico, especialmente aqueles que apresentam a forma extraparenquimatosa da doença (Cárdenas et al., 2010), dado que a biodisponibilidade dos fármacos é mais baixa no líquido em razão da barreira hemato-liquórica (Bonato et al., 2007). Adicionalmente, a heterogeneidade de resposta ao tratamento parece ligada ao estado inflamatório dos pacientes (Cárdenas et al., 2014).

Finalmente, uma das diferenças mais marcantes da neurocisticercose é entre os sexos. Em geral, mulheres apresentam as formas mais graves da doença, o que sugere haver influência de hormônios sexuais na resistência ou suscetibilidade ao parasita (Nava-Castro et al., 2012).

Evidências clínicas da diferença de neurocisticercose entre os sexos e o papel de hormônios esteroidais

É bem conhecido que esteroides sexuais regulam diversas funções orgânicas como crescimento, reprodução e diferenciação celular. Mais recentemente, tem chamado atenção o papel hormonal na regulação de respostas imunológicas contra patógenos específicos. A suscetibilidade a parasitas como *Plasmodium sp*, *Leishmania sp*, *Trypanosoma cruzi* e *Entamoeba histolytica* é maior com hormônios masculinos do que com femininos. Com *T. solium*, porém, ocorre o oposto (Nava-Castro et al., 2012).

Uma das primeiras observações da diferença da apresentação clínica da neurocisticercose entre homens e mulheres foi feita por Rangel e colaboradores, 1987, notando que uma forma grave da neurocisticercose, a encefalite cisticercótica, ocorria principalmente em mulheres jovens (Rangel et al., 1987). Em 1988, Del Brutto e colaboradores especificamente compararam a doença entre homens e mulheres. Os autores analisaram características de tomografia computadorizada de 100 pacientes com a forma parenquimatosa da doença e observaram que

as mulheres apresentavam mais edema e captação de contraste pericístico que os homens, sugerindo diferenças biológicas na resposta à doença entre os dois sexos (Del Brutto et al., 1988).

Fleury e colaboradores (2004) analisaram o líquido de pacientes com neurocisticercose e observaram maior contagem de leucócitos em mulheres que em homens, demonstrando maior intensidade de inflamação em mulheres. Também observaram que a intensidade da resposta inflamatória diminuiu nos pacientes com idade por volta de 50 anos (quando, geralmente, há mudança no padrão hormonal feminino), sugerindo que mecanismos imuno-endocrinológicos estejam envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da doença (Fleury et al., 2010).

Em análise de marcadores inflamatórios no líquido de pacientes com neurocisticercose, Chavarría e colaboradores (2005) encontraram níveis mais elevados de interleucinas 5, 6 e 10 em mulheres que em homens. E, embora sem diferença estatística, os níveis de imunoglobulinas IgG2 e IgG3 também eram maiores em mulheres que em homens (Chavarría et al., 2005).

Kelvin e colaboradores (2009) analisaram exames de imagem de 171 pacientes, com foco na visualização de cistos transicionais, ou seja, aqueles que passam da fase coloidal para a forma granulomatosa e que, portanto, estão sob resposta inflamatória, excluindo a forma calcificada. Encontraram uma chance 1,8 vezes maior da ocorrência destes cistos em mulheres que em homens (Kelvin et al, 2009).

Cárdenas e colaboradores (2012) demonstraram haver, de fato, diferenças endocrinológicas em pacientes com neurocisticercose. Comparados a controles saudáveis, os pacientes com neurocisticercose apresentaram níveis mais baixos de dehidroepiandrosterona (DHEA). Além disso, homens com a doença apresentaram níveis mais baixos de 17- β -estradiol (E2) e mais altos de hormônio luteinizante (LH). Entre os homens com doença grave, os níveis de testosterona estavam mais baixos e os de hormônio folículoestimulante (FSH), mais altos que os homens com formas leves da doença. Já entre as mulheres, aquelas com as formas graves apresentaram níveis significativamente mais baixos de progesterona e androstenediona do que aquelas com a doença mais leve. Finalmente, também encontraram correlação negativa entre os níveis de E2 e de interleucina-10 (IL-10), uma citocina imunomoduladora, demonstrando a participação de mecanismos imuno-endocrinológicos na fisiopatologia da neurocisticercose (Cárdenas et al., 2012; Sciutto et al., 2013).

Em suma, as mulheres apresentam mais frequentemente a forma encefalítica grave da doença, mais inflamação ao redor dos parasitas e mais reações inflamatórias no líquido (Fleury et al., 2010), e essas diferenças estão associadas a alterações hormonais específicas.

Do ponto de vista terapêutico, o uso de corticoesteróides está recomendado para prevenir a exacerbação de sintomas clínicos atribuíveis à resposta inflamatória decorrente da destruição dos parasitas (White-Jr et al., 2018). Por outro lado, a administração de corticoesteróides favorece à própria sobrevivência dos parasitas (ou seja, o controle da inflamação favorece o hospedeiro, mas também o parasita) (Toledo et al., 2018). Isso se dá por três mecanismos: os esteroides induzem imunossupressão, dificultando a eliminação dos parasitas; os esteroides estimulam a proliferação de células T regulatórias e a produção de TGF β , uma molécula que pode promover a sobrevivência do parasita (Adalid- Peralta et al., 2017); os esteroides podem ser metabolizados pelo parasita, estimulando sua capacidade reprodutiva (Romano et al., 2015).

Portanto, a participação de hormônios esteroidais é relevante para a infecção, para a suscetibilidade ao desenvolvimento dos sintomas e para o manejo terapêutico da doença.

Dimorfismo sexual da cisticercose em animais

Num estudo de prevalência de cisticercose em porcos, numa comunidade mexicana com fatores facilitadores da transmissão da doença, Morales e colaboradores fizeram observações condizentes com a influência de fatores hormonais para o desenvolvimento da doença. Foram analisados 1087 animais e a prevalência de cisticercose foi de 35% em machos e de 31% em fêmeas. No entanto, durante o período de observação, 45% dos machos foram castrados e esses animais tiveram prevalência de cisticercose maior que os machos não castrados. Além disso, 7% das fêmeas se tornaram prenhas no período, e a prevalência foi de 28% entre as não prenhas para 59% entre as prenhas. Portanto, baixos níveis de andrógenos e altos níveis de hormônios femininos provavelmente interferiram com a suscetibilidade dos animais à infecção (Morales et al., 2006). Outra publicação também mostrou maior prevalência de infestação por *Taenia pisiformes* em coelhos, sendo maior em fêmeas que em machos ($p = 0,02$) (Domínguez-Roldan et al., 2018).

Dimorfismo sexual da cisticercose experimental por T. crassiceps

T. crassiceps é uma espécie de tênia análoga a *T. solium*. A espécie foi descrita em 1800 por Zeder, e seu ciclo biológico tem em raposas, lobos e cães seu hospedeiro definitivo e, em roedores, seu hospedeiro intermediário (Willms e Zurabian, 2010). Ela é uma das espécies de taenia que possui uma das maiores capacidades reprodutivas, sendo possível manter cepas na cavidade peritoneal de camundongos, pois os parasitas se reproduzem por gemulação. Observações antigas já apontavam que as taxas de replicação dos cistos eram maiores em camundongos fêmeas do que em machos (Freeman, 1962; Chernin, 1975). Subsequentemente, diversos trabalhos objetivaram, portanto, estudar as diferenças hormonais entre machos e fêmeas na suscetibilidade a *T. crassiceps*.

A remoção cirúrgica das gônadas altera a suscetibilidade à infecção por *T. crassiceps*. Huerta e colaboradores observaram que a ovariectomia reduziu à metade a quantidade de cistos intraperitoneais em fêmeas, enquanto a orquiectomia quase triplicou a quantidade de cistos em machos. Os autores sugeriram que eventos imunológicos envolvidos no controle do crescimento intraperitoneal de *T. crassiceps* seriam inibidos pelos ovários e estimulados pelos testículos (Huerta et al., 1992).

No entanto, análises de infecções a longo prazo mostram que a carga parasitária em machos tende a se igualar à de fêmeas, o que se acompanha de alterações hormonais séricas nos machos, com aumento dos níveis de estrógeno e redução dos níveis de testosterona (Larralde et al., 1995). A mudança de perfil hormonal em machos infectados com *T. crassiceps* é capaz, inclusive, de inibir seu comportamento sexual (Morales et al., 1996), o que sugere que os próprios parasitas são capazes de alterar o microambiente hormonal do hospedeiro como forma de adaptação para que possam se desenvolver. Isso ficou provado com estudo *in vitro* que mostrou que *T. crassiceps* converte 3H-androstenediona em 3H-testosteona numa forma semelhante à ação da enzima 17-b-hidroxiesteroide desidrogenase (Gomez et al., 2000).

A relação entre hormônios sexuais e atividade imunológica na cisticercose experimental foi demonstrada por estudo de Morales-Montor e colaboradores (2002); após a castração de camundongos e antes da infecção por *T. crassiceps*, os autores trataram os animais com testosterona, di-hidrotestosterona e 17-b- estradiol. O tratamento com hormônios masculinos diminuiu a carga parasitária em 50 a 70%, enquanto o tratamento com hormônios femininos aumentou em até três vezes. A castração reduziu a proliferação de esplenócitos e a produção

de IL-2 e interferon- γ (IFN- γ) enquanto o tratamento com testosterona e dihidrotestosterona aumentou a proliferação de esplenócitos e a produção de IL-2 e IFN- γ , o tratamento com estradiol aumentou os níveis de IgG anti-cisticerco e a produção de IL-6 e IL10 (Morales-Montor et al., 2002).

Já sob uma perspectiva de pesquisa translacional, Vargas-Villavicencio e colaboradores (2007) testaram o efeito do tamoxifeno (uma droga comumente utilizada no tratamento do câncer de mama) na cisticercose murina. Obtiveram uma redução de 80% da carga parasitária em fêmeas e de 50% em machos. Esse efeito protetor da droga foi acompanhado de um aumento dos níveis de RNAm de IL-2 (citocina associada a efeito protetor contra o parasita). *In vitro*, observaram que o tamoxifeno reduz a capacidade de reprodução e de mobilidade do parasita. Dessa forma, abriram novas perspectivas terapêuticas para o tratamento clínico da cisticercose (Vargas-Villavicencio et al., 2007).

Os efeitos diretos dos hormônios sexuais sobre *T. crassiceps* foram estudados mais recentemente. O tratamento *in vitro* com estradiol e progesterona alterou a expressão de actina, tubulina e miosina, proteínas necessárias à estrutura e função das células-flama (que constituem o sistema excretório do parasita). Essa alteração otimizou a montagem das células-flama (Ambrosio et al., 2014). Efeito contrário foi observado com testosterona e di-hidrotestosterona: apesar desses hormônios não alterarem a expressão de actina, tubulina e miosina, eles se ligam a essas proteínas comprometendo a montagem, estrutura, mobilidade e função das células-flama, o que, em última análise, promove ruptura do tegumento do parasita, reduzindo sua viabilidade biológica (Ambrosio et al., 2015).

Modelos experimentais de neurocisticercose foram desenvolvidos na última década, como foco especial para a forma parenquimatosa da doença. Através da inoculação intracraniana de *Mesocostoides corti* em camundongos, estudaram-se mecanismos envolvidos na ruptura da barreira hemato-encefálica e na infiltração leucocitária (Alvarez e Teale, 2007a; Alvarez e Teale, 2007b; Alvarez e Teale, 2008; Alvarez et al., 2010). Esses modelos têm sido especialmente úteis para o conhecimento aprofundado dos mecanismos fisiopatológicos da doença pois, apesar de bastante estudada, a neurocisticercose ainda suscita diversas dúvidas a respeito de sua fisiopatologia, pois o estudo em humanos é limitado pela dificuldade de obtenção de tecidos biológicos e pela interferência do tratamento com cisticidas e corticoesteróides.

Além disso, a forma extraparenquimatosa da neurocisticercose é mais agressiva e desperta mais controvérsias, especialmente em relação à conduta terapêutica, com níveis de evidência mais baixos para as recomendações de tratamento (Fleury et al, 2011; White-Jr et al, 2018). Por isso, nosso grupo desenvolveu um modelo de neurocisticercose extraparenquimatosa em ratos através da inoculação subaracnóidea de cistos de *T. crassiceps*. Os estudos conduzidos até o momento demonstraram infiltrado linfocitário, meningite e hidrocefalia (Hamamoto Filho et al., 2017; Hamamoto Filho et al., 2019). Todos os estudos, porém, foram conduzidos utilizando-se ratos machos. Suscita-se, assim, a pergunta de pesquisa: a neurocisticercose extraparenquimatosa experimental em ratos fêmeas produz alterações morfológicas e inflamatórias mais intensas que em machos?

Justificativa

Justificativa

A diferença entre os sexos para a cisticercose está bem determinada em diversos estudos experimentais que basearam suas análises na inoculação de *T. crassiceps* na cavidade peritoneal de roedores. Nenhum estudo até o momento verificou se há diferenças entre os sexos na neurocisticercose experimental, ou seja, na inoculação intracraniana de parasitas.

Objetivo

Objetivo

Comparar se as reações inflamatórias da neurocisticercose extraparenquimatosa experimental em ratos fêmeas é mais intensa que em machos através de infiltrado inflamatório e concentração de IL-6, IL-10 e IFN-gama.

Métodos

Métodos

Animais de experimentação

Foram utilizados 76 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 150-200g, sendo 42 fêmeas e 34 machos, com idade entre 6 e 7 semanas, provenientes do Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no Biotério de Roedores 1 da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp), em caixas de polietileno (medindo 40x30x15cm), com fundos sólidos forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h claro/12h escuro), temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo fornecida água filtrada e ração Presence® *ad libitum*. O projeto de pesquisa e todos os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu. Perdas de animais foram compensadas com inclusão de novos para atingir número necessário em cada grupo.

Delineamento experimental

Os 76 animais foram submetidos à inoculação cisternal de *T. crassiceps*, de acordo com a técnica padronizada pelo grupo (Hamamoto Filho et al., 2015). Decorridos o período experimental de 90 dias após a inoculação, os animais foram submetidos a eutanásia, com overdose de cetamina e xilazina intraperitoneal, para retirada do encéfalo. Os animais sem cistos visíveis no momento da eutanásia foram descartados. Metade dos animais foi submetida a estudo morfológico e a outra metade a estudo imunoenzimático.

Parasitas e inoculações

Cistos de *T. crassiceps* (cepa ORF), mantidos na cavidade peritoneal de camundongos do biotério da UNIPEX (protocolo de manutenção de metacestodos de *Taenia crassiceps* em camundongos – certificado CEUA n. 1255/2017), foram retirados de forma asséptica e selecionados de acordo com a sua viabilidade (Figura 1).

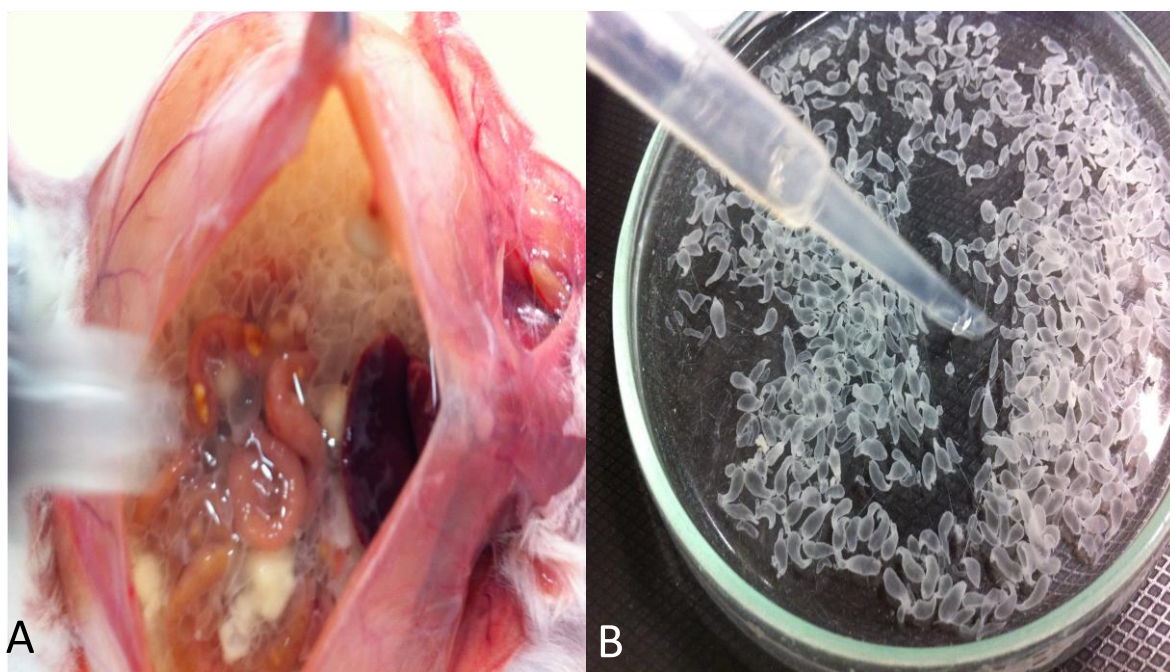


Figura 1: Em A, observa-se a captação asséptica de cistos de *Taenia crassiceps* no abdome dos camundongos; em B, visualizamos a seleção manual de cistos em placa de Petri, de acordo com sua viabilidade e tamanho.

Para a inoculação, ratos Wistar foram anestesiados com uma solução anestésica de cetamina na dose de 87 mg/kg e xilazina na dose de 13 mg/kg. A inoculação foi feita após incisão de 1cm na pele na transição occípito-cervical, com punção suboccipital da cisterna magna com agulha de 25G e inoculação de 50 cistos viáveis de *T. crassiceps* em 0,2 ml de soro fisiológico. A sutura da pele foi feita em seguida com fio mononylon 4.0. Após a inoculação, foi administrada dipirona em dose única de 150 mg/kg, via intraperitoneal.

Durante todo período de observação, os animais foram avaliados diariamente para detecção de desconforto físico.

Análise histológica

Após eutanásia com overdose de cetamina e xilazina intraperitoneal, foi realizada perfusão cardíaca. Para isso, foi realizada toracotomia e exposição das vísceras torácicas, e a perfusão ocorreu por meio do ventrículo esquerdo com canulação da aorta (Fig. 2), utilizamos bomba dosadora peristáltica para a perfusão, inicialmente com PBS (tampão fosfato salino) a 0,1M e posteriormente fixação com paraformaldeído a 4%, ambos em um fluxo de 30 mL/minuto. A aurícula direita foi seccionada junto ao átrio direito para escoamento do sangue e de líquidos excedentes. Em sequência, estes animais também foram submetidos à craniectomia seguida da

retirada do encéfalo. Posteriormente seccionado no plano transversal na topografia do quiasma óptico para avaliação quanto: hidrocefalia e presença de cistos. No total foram 15 encéfalos, sendo 8 fêmeas e 7 machos, estes encéfalos foram seccionados transversalmente, utilizando-se matriz de encéfalo (Insight, Brasil) para cortes comparáveis, os fragmentos, em seguida, foram colocados em cassetes e mantidos em paraformaldeído por 4 horas em temperatura ambiente. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em banhos de álcool, clarificadas em xilol, então parafinizadas.



Figura 2: Toracotomia com exposição das vísceras torácicas para perfusão cardíaca, realizada por meio da canulação da aorta através ventrículo esquerdo.

Para análise da morfologia geral do encéfalo, os blocos foram seccionados em micrótomo com espessura de 5 μ m e coradas com hematoxilina e eosina. A análise morfométrica foi realizada quantificando a presença de células inflamatórias na aracnoide, na região periventricular pericaudado e no plexo coroide. A análise foi baseada na contagem de retículo de Weibel (Weibel et al., 1966), um modelo matemático que transforma aquisição bidimensional em tridimensional de modo quantitativo. São contadas as estruturas estudadas que cruzam com as retas do retículo, dividindo-se pelo total de retas.

Ensaio imunoenzimático

Após eutanásia com overdose de xilazina e cetamina por via intraperitoneal, foi realizada craniectomia para remoção dos encéfalos, os quais, a seguir, foram transportados em nitrogênio líquido e congelados a -80° C.

Para o ensaio imunoenzimático, os encéfalos foram descongelados sob controle de temperatura. A técnica foi baseada no método padronizado por Milhomem. Os hemisférios cerebrais congelados anteriormente foram sonicados com uma solução de Tris e HCl, NP40 1% e inibidor de protease. As citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ foram quantificadas na solução homogeneizada de tecido cerebral através do método ELISA-sanduiche de acordo com as instruções do fabricante (BD OptEIA™). A dosagem de IL-6 e IL-10 foi feita respectivamente com IL-6 ELISA - BD OptEIA™ (BD Biosciences, San Diego, CA) e IL-10 ELISA - BD OptEIA™. A dosagem de IFN- γ foi feita com microplacas ELISA de alta ligação sensibilizadas com anticorpo monoclonal IFN- γ (5 μ g/ μ l do clone XMG em PBS). A medida foi determinada através de leitor de microplaca Thermo/Labsystems, usando filtros específicos para cada citocina. As dosagens foram realizadas em duplicata. (Milhomem et al 2018).

Ressonância magnética

Dez animais (5 machos e 5 fêmeas), selecionados aleatoriamente, foram submetidos a exame de ressonância magnética em aparelho 7T Siemens Magnetom scanner (Siemens, Erlanger, Germany), na Universidade de São Paulo, utilizando sequência axial T2 (TE 58 mf, TR 6000 ms, 0.27 mm no plano, 1 mm de espessura).

Análise estatística

Para determinar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação de dois grupos independentes com dados não paramétricos. Para variáveis com distribuição normal, foi realizado o teste t de student para comparação dos grupos. Diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$. Para as análises, foi utilizado o software SPSS v. 21.0 (IBM Corp, Armonk, Nova York, EUA) e GraphPad Prism v. 8.2.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Resultados

Resultados

Utilizamos um total de 76 animais para o estudo, inoculamos 34 ratos machos e 42 ratos fêmeas. No grupo de machos, 22 sobreviveram e 13 desenvolveram neurocisticercose. No grupo de fêmeas 25 sobreviveram e 15 desenvolveram neurocisticercose. Dos 13 machos, 7 foram usados para estudo morfológico, e 6 para estudo imunoenzimático. Das 15 fêmeas, 8 foram usadas para estudo morfológico, e 7 para estudo imunoenzimático (Figura 3).

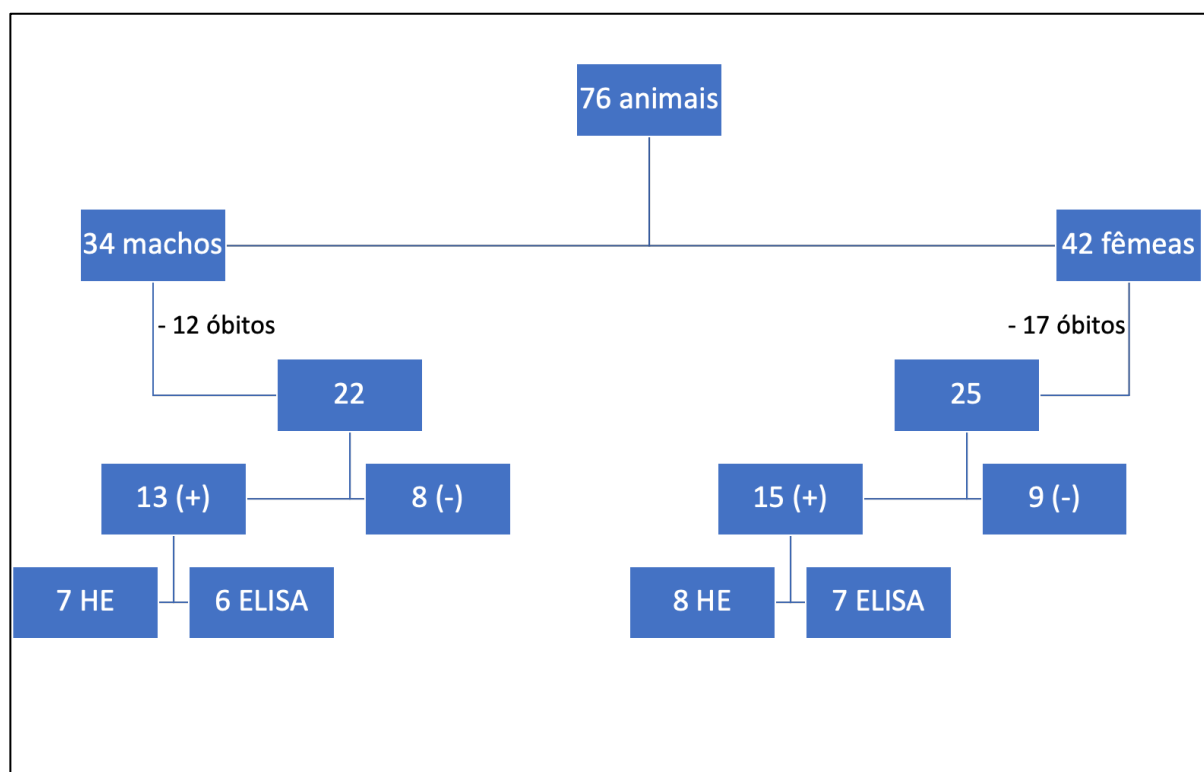


Figura 3: Fluxograma do delineamento experimental.

Análise histológica

Para a análise histológica utilizamos 7 encéfalos de ratos machos e 8 encéfalos de ratos fêmeas. A análise histológica evidenciou maior número de linfócitos nos encéfalos de ratos fêmeas quando comparados aos ratos machos na região aracnoide (Figuras 4 e 5), não sendo possível identificar o aumento significativo de linfócitos na região do plexo coroide e na área periventricular (Figuras 4 e 5). Apesar de também haver aumento do número de linfócitos nos encéfalos dos ratos machos em todas as regiões estudadas, esse aumento não foi significativo. O número de plasmócitos mostrou-se elevado nos encéfalos de ratos fêmeas nas regiões: aracnoide e periventricular pericaudado, quando comparados as regiões homólogas dos ratos

machos e não houve diferença significativa na região do plexo coroide quando comparada a mesma região dos encéfalos dos ratos machos (Figura 6).

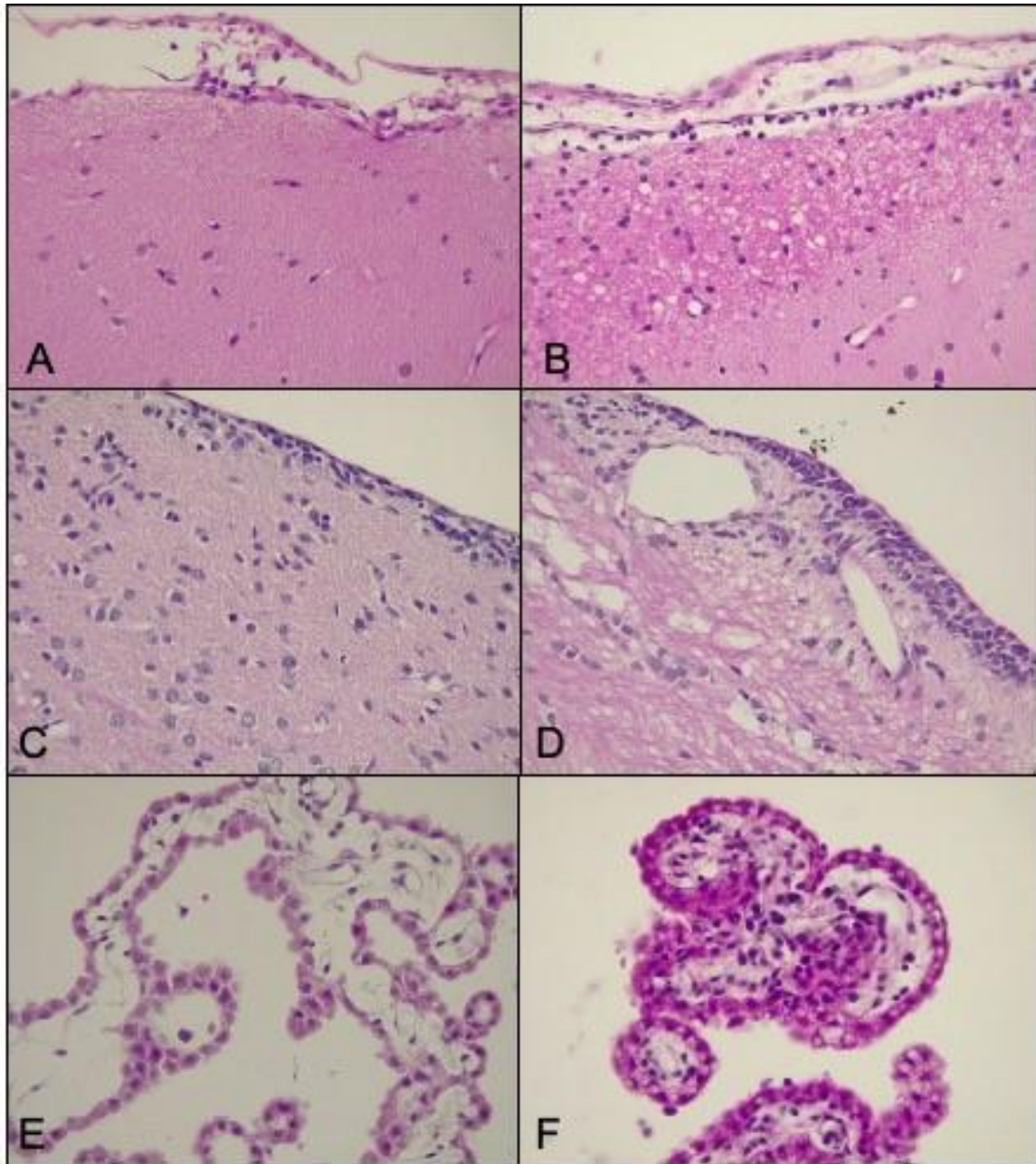


Figura 4: Fotomicrografia do encéfalo de ratos, coloridas por hematoxilina-eosina com aumento de 40 vezes. Região da aracnoide (próximo a cisterna magna), em A: linfócitos nos encéfalos ratos machos; em B: linfócitos nos encéfalos de ratos fêmeas. Região periventricular subependimária. C: linfócitos nos encéfalos ratos machos; em D: linfócitos nos encéfalos de ratos fêmeas. Região plexo coroide (estroma). E: linfócitos nos encéfalos ratos machos; em F: linfócitos nos encéfalos de ratos fêmeas.

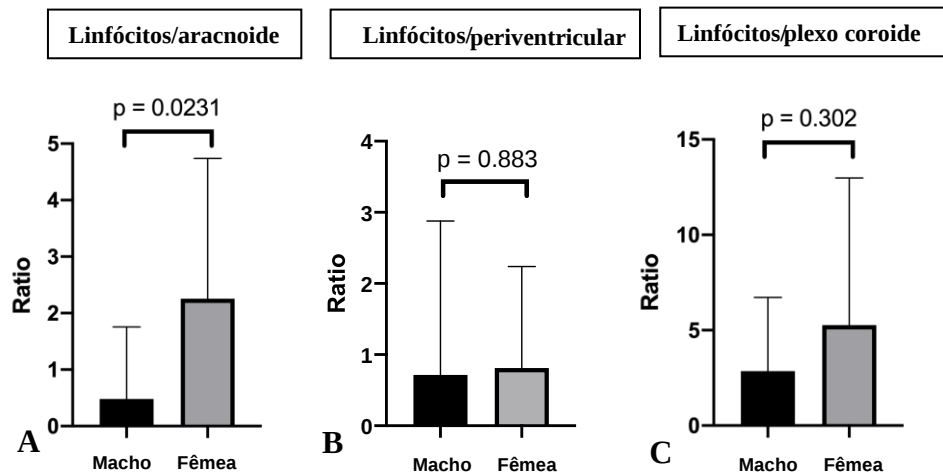


Figura 5: Análise estatística do número de linfócitos por área do encéfalo (aracnoide, periventricular e plexo coroide) comparando os encéfalos de ratos machos e fêmeas, foi observado um aumento do número de linfócitos nos encéfalos dos ratos machos e fêmeas em todas as regiões estudadas, sendo, significativamente maior nas fêmeas na região da aracnoide. Em A: linfócitos na região da aracnoide; em B: linfócitos na região da área periventricular; em C: linfócitos na região da área plexo coroide

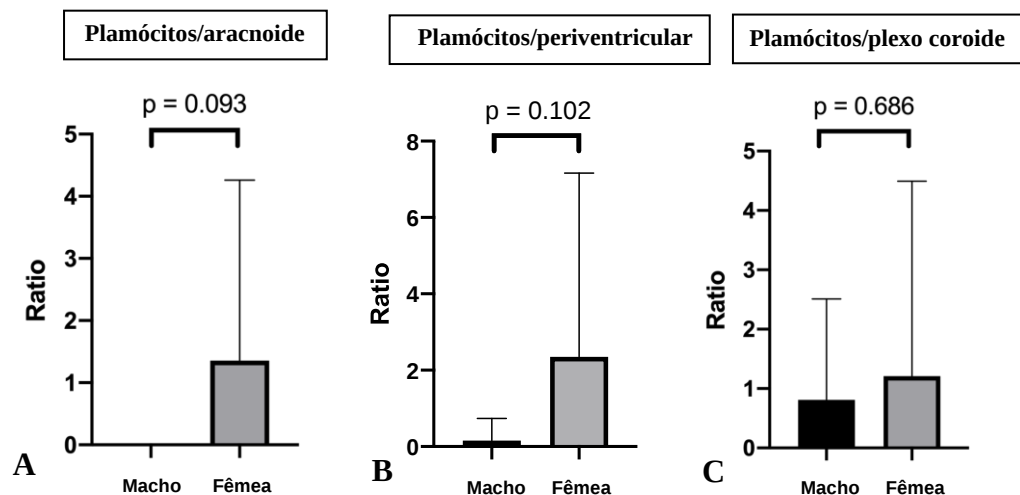


Figura 6: Análise estatística do número de plasmócitos por área do encéfalo (aracnoide, periventricular e plexo coroide) comparando os encéfalos de ratos machos e fêmeas, foi observado um aumento do número de plasmócitos nos encéfalos dos ratos fêmeas em todas as regiões estudadas, sendo,

significativo na região da aracnoide e periventricular pericaudado. Em A: plasmócitos na região da aracnoide; em B: plasmócitos na região da área periventricular; em C: plasmócitos na região da área plexo coroide

Ensaio imunoenzimático

Para o estudo imunoenzimático os hemisférios cerebrais congelados foram sonicados com uma solução de Tris e HCl, NP40 1% e inibidor de protease e as citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ foram quantificadas na solução homogeneizada de tecido cerebral através do método ELISA-sanduíche.

O estudo evidenciou níveis mais altos de citocina IL-6 ($p = 0,014$), no encéfalo de fêmeas quando comparados aos encéfalos de machos. A citocina IL-10 ($p = 0,351$), não apresentou diferença significativo quando comparamos os encéfalos dos ratos dos grupos macho e fêmea e a citocina IFN- γ ($p = 0,05$), não evidenciou diferença quando comparamos os encéfalos dos ratos do grupo masculino e feminino (Figura. 7).

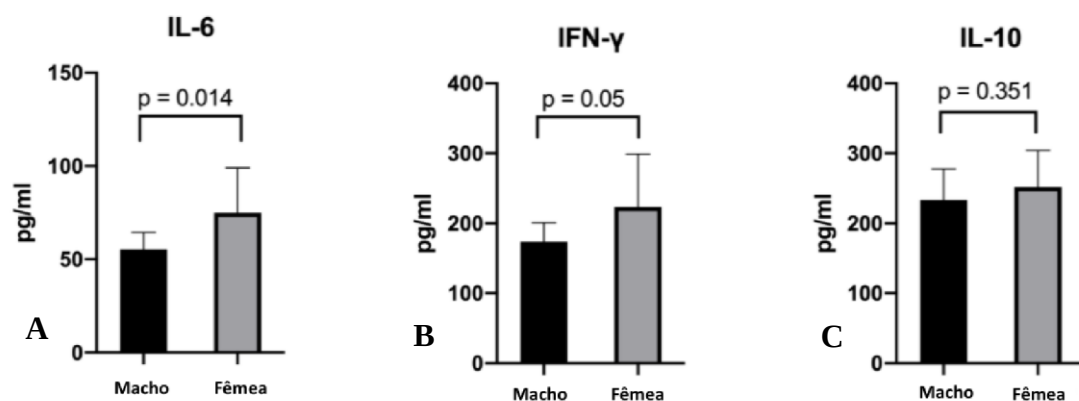


Figura 7: Estudo imunoenzimático dos encéfalos de ratos machos e fêmeas, as citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ foram quantificadas nos hemisférios cerebrais através do método ELISA-sanduíche. Foi observado níveis mais elevados de IL-6 nos encéfalos de ratos fêmeas; já as citocinas IL-10 e IFN- γ não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos encéfalos comparados. Em A: Interleucina 6; em B: Interferon - γ ; e em C: Interleucina 10.

Ressonância magnética

Foi possível através do exame de ressonância magnética (7T Siemens Magnetom scanner - Siemens, Erlanger, Germany) observar os animais que desenvolveram hidrocefalia.

Observamos que a hidrocefalia era mais frequente e intensa nos encéfalos de ratos fêmeas quando comparadas aos dos ratos machos. (Figura 8).

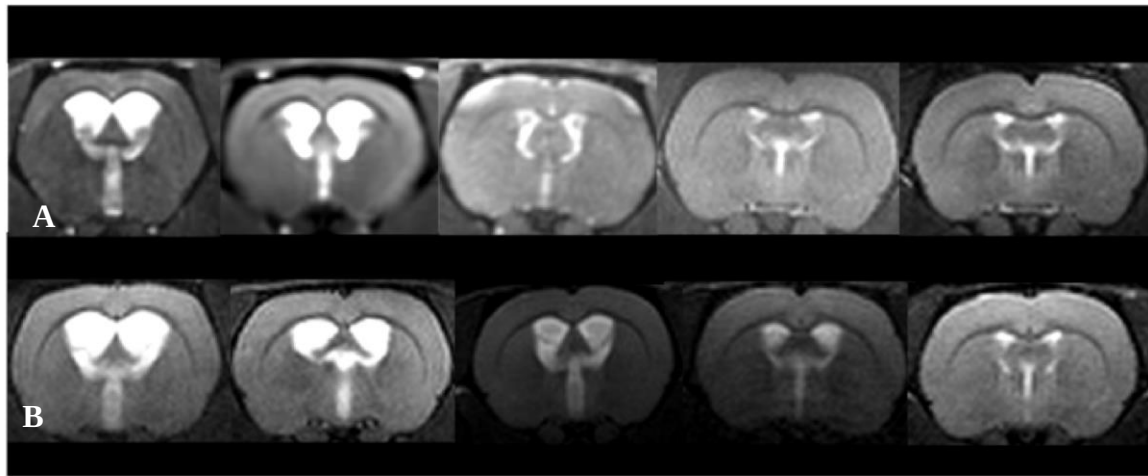


Figura 8: Exame de ressonância magnética para comparação dos cérebros de ratos machos e fêmeas; os exames foram realizados em um aparelho de ressonância magnética 7T Siemens Magnetom scanner (Siemens, Erlanger, Germany), na sequência axial T2. Em A: Cérebros de ratos machos, e em B cérebro dos ratos fêmeas. Podemos observar a maior dilatação ventricular no cérebro da fêmea quando comparada ao macho.

Discussão

Discussão

A diferenciação de Th0 para Th1 ou Th2 é simétrica. Cada um controla um tipo único de resposta imune e aumenta o desenvolvimento de células da mesma subclasse enquanto suprime as funções de expansão e efetividade do outro subtipo. Os esteroides sexuais podem controlar o equilíbrio Th1/Th2 induzindo o desenvolvimento e predomínio de um subtipo sobre o outro. Progesterona e a testosterona favorecem a expansão das células Th2, o que pode explicar parcialmente sua ação imunossupressora em diversas patologias. Por outro lado, o estradiol tem um efeito duplo dependendo da concentração. Os esteroides sexuais: estrogênio, progesterona e testosterona podem modular a atividade das células imunes contra helmintos e parasitas e mediar as diferentes respostas imunes entre os sexos. Os hormônios associados à gravidez também influenciam o desfecho das doenças helmínticas (Morales et al 2002).

Mulheres jovens frequentemente apresentam manifestações clínicas mais severas da doença, e maior predomínio de cisticercos degenerados do que os homens. A prevalência destes cisticercos pode ser afetada pelo *status* hormonal do hospedeiro, portanto, o fato das mulheres apresentarem as formas mais graves da doença, sugere haver influência de hormônios sexuais na resistência ou suscetibilidade ao parasita (Del Brutto et al., 1988; Chavarría et al., 2005).

Situações de estresse não fisiológico aumentam o nível plasmático de corticosteroides com consequente impacto sobre a resposta imune. Além disso, o próprio parasita pode alterar o microambiente hormonal ao seu redor: *T. solium* e *T. crassiceps* (Cepa ORF) são capazes de transformar precursores de esteroides como progesterona, dehidroepiandrosterona (DEHA), e androstenediona, em andrógenos e estrógenos (Romano et al 2015).

Em nosso trabalho, a análise histológica evidenciou maior número de linfócitos nos encéfalos das fêmeas quando comparadas aos machos em todas as regiões estudadas: aracnoide, área periventricular e no plexo coroide, embora a diferença significativa tenha sido observada apenas na região da aracnoide. A mesma tendência foi observada com relação ao número de plasmócitos que também se mostraram mais elevados nos encéfalos de ratos fêmeas em todas as regiões estudadas quando comparadas aos machos: regiões aracnoide, área periventricular e no plexo coroide, embora, a diferença significativa tenha sido encontrada nas regiões aracnoide e periventricular. A presença de maior número de linfócitos na região aracnoide pode ser

explicada pela técnica empregada para inoculação dos parasitas – ou seja, como os parasitas estavam no espaço subaracnoide, é esperada mais inflamação na própria aracnoide.

Estudos histológicos em porcos e humanos demonstraram que cisticercos viáveis na fase vesicular têm pouca ou nenhuma inflamação ao redor, sendo compostos por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos (Carpio et al 1998; Aluja et al 1988). À medida em que os cistos se degeneram evoluindo para a fase coloidal surge uma resposta inflamatória intensa, tendo predomínio de linfócitos T, macrófagos e células plasmáticas. Durante a fase granular observase a presença de plasmócitos, linfócitos B e T, macrófagos e mastócitos. E, finalmente, durante fase calcificada há predomínio de astrócitos e de proliferação glial. Portanto a resposta imune é influenciada pelo estágio do parasita (Fleury et al 2016).

O cisticerco em degeneração inicia uma resposta pró-inflamatória que leva ao rompimento da barreira hematoencefálica seguido pela infiltração de células imunes no sítio da infecção (Restrepo et al, 2001; Singh et al, 2015). Cistos degenerados nos compartimentos liquóricos estão associados a uma maior resposta inflamatória, ocasionando meningite e vasculite. O processo inflamatório (aracnoidite) também leva a um prejuízo na absorção e um obstáculo à circulação do fluxo liquórico podendo desencadear hidrocefalia e consequências mais graves.

É importante ressaltar que na neurocisticercose alguns indivíduos com lesões similares permanecem assintomáticos enquanto outros desenvolvem sintomas exuberantes. Os mecanismos pelos quais diferentes respostas se manifestam ainda não foram totalmente elucidados. A resposta imune pode destruir as oncosferas e os cisticercos invasores protegendo o hospedeiro, ou pode promover injúria nos tecidos adjacentes e causar reações inflamatórias no encéfalo com graves consequências clínicas. Uma regulação inadequada da resposta inflamatória pode, portanto, exacerbar a manifestação clínica da doença com consequências ao hospedeiro.

No nosso ensaio imunoenzimático observamos níveis significativamente elevados de IL-6 em ratos fêmeas com neurocisticercose extraparenquimatosa experimental quando comparados aos machos, o que corrobora com a hipótese da heterogeneidade do perfil de suscetibilidade relacionado a fatores hormonais. A implicação de moduladores biológicos produzidos pelo hospedeiro durante a inflamação é fundamental para a sua graduação e resolução. A resposta imune ao nível celular é caracterizada pelo aumento do IFN- γ , IL-6 e IL10, cuja elevação pode ser observada em vários estágios da degeneração do parasita (Fleury et al 2016). Entretanto,

independentemente da localização do parasita e da resposta inflamatória, foi observado aumento da celularidade, das citocinas IL-5, IL-6, IL-10 e de todas as subclasses de IgG no líquido, sendo sempre mais intensa no sexo feminino que no masculino (Fleury et al 2010).

Estudo experimental conduzido por Matos-Silva e colaboradores em camundongos observou que os camundongos BALB/c apresentaram lesões inflamatórias com maior intensidade, induzindo necrose nos parasitas em estágio tardio, porém, com padrão de inflamação aguda, enquanto camundongos C57BL/6 apresentaram maior capacidade de provocar necrose precoce nos cisticercos, porém, apresentavam padrão de inflamação crônica (Matos-Silva et al 2012).

Moura e colaboradores estudaram a resposta de camundongos BALB/c a inoculação intracraniana de cisticercos de *T. crassiceps*, e constataram que, apesar de não apresentarem diferenças significativas nas dosagens in situ das citocinas, havia a predominância do perfil imunológico Th1, com maiores concentrações de IFN- γ e IL-4, o que permitia a sobrevivência do parasita.

Em nosso estudo as citocinas IFN- γ e IL-10 não apresentaram diferença significativa quando comparamos os encéfalos das fêmeas com os dos machos o que pode ser explicado pela duração do estudo, de 3 meses, o que pode ter impedido que a resposta destas citocinas se manifestasse a contento.

Milhomem e colaboradores também realizaram experimento com inoculação intracraniana de *T. crassiceps*, usando camundongos C57BL/6 e observaram a predominância do perfil imunológico Th2. A capacidade de imunomodulação dos cisticercos é responsável pelo perfil imunológico observado nestes camundongos. Antígenos do parasita estimulam a produção de anticorpos e a liberação de mediadores químicos incapazes de destruir o cisticerco. Isso acontece porque o parasita simultaneamente modula a ação desses componentes imunes para se tornar viável por mais tempo, influenciando assim a mudança de um perfil imunológico de Th1 para Th2, desta forma ele protege o tecido de danos, ativa macrófagos com menor potencial microbicida e gera a ativação e expansão de plasmócitos. Além disso, a secreção de IgE, presença de eosinófilos, mastócitos e basófilos são incapazes de destruir o parasita.

A dosagem de IL-10 detectada no estudo de Milhomem aventa que a presença desta citocina no tecido cerebral pode modular as respostas imunes Th1 e Th2. A IL-10 é um potente inibidor da apresentação de antígenos, dos mediadores e da produção de citocinas próinflamatórias por macrófagos, células dendríticas e células Th1. Ela tem um importante papel regulador na

resposta inflamatória do hospedeiro durante a infecção. A concentração estatisticamente maior de IL-10 neste estudo sugere haver regulação da resposta imune dos camundongos, influenciando a mudança na resposta imune do perfil Th1 para o perfil Th2, o que diminui o dano ao parênquima e contribui para a sobrevivência do parasita (Milhomem et al 2018).

A produção de altos níveis de IL-10 induzidos pela supressão da resposta imune mediada por células T regulatórias cria um ambiente imunomodulador favorável para o desenvolvimento da *T. solium* no SNC (Arce-Sillas et al 2016). A queda dos níveis desta citocina será, portanto, crítica no manejo da neurocisticercose pois o processo inflamatório também está implicado na patogênese da doença.

O exame de ressonância magnética mostrou-se uma importante ferramenta para identificar os animais que desenvolveram a doença e o grau de acometimento levando-se em conta o desenvolvimento de hidrocefalia. No entanto, pelo fato de ter sido realizado em 5 animais de cada sexo, isso não permitiu que tivéssemos confiabilidade, pois não sabemos se os animais eram representativos de seus respectivos grupos. Todavia, pelas imagens adquiridas, pudemos visualizar que a hidrocefalia foi mais intensa nas fêmeas quando comparadas às imagens de machos.

A heterogeneidade entre os sexos na evolução e apresentação de doenças parasitárias, dentre elas a neurocisticercose já está bem estabelecida. No entanto, os mecanismos pelos quais ela se manifesta ainda precisam ser mais bem estudados e compreendidos. Dentre os tipos de neurocisticercose a extraparenquimatosa é a mais agressiva, imprevisível e de mais difícil tratamento. O nosso grupo desenvolveu um modelo experimental de neurocisticercose extraparenquimatosa que nos permite avaliar as alterações histológicas e imunohistoquímicas em ratos. Este modelo experimental é efetivo para o desenvolvimento da neurocisticercose extraparenquimatosa experimental e promissor para o estudo dos mecanismos imunes envolvidos no seu desenvolvimento o que pode nos permitir compreender futuramente a evolução e desenvolvimento da doença em humanos. O alvo do tratamento deve ser o controle da inflamação, devemos considerar a modulação neuroendócrina na resposta inflamatória e o uso de drogas anti-inflamatórias mais específicas.

Este estudo apresenta algumas limitações: primeiramente, não tivemos grupo controle para comparação com os ratos infectados. Este grupo nos permitiria avaliar e comparar as citocinas entre sadios e infectados, poderíamos assim determinar se realmente há aumento quando

comparamos os dois grupos, pois é possível que fêmeas apresentem um perfil próinflamatório natural com níveis mais elevados IL-6 (Nava-Castro et al 2022). A segunda limitação é a possível interferência cíclica de hormônios nos resultados observados: uma vez que os hormônios regulam e induzem uma resposta inflamatória mais exuberante no sexo feminino, seria importante observar em qual fase do ciclo estral a inoculação pode ter sido mais ou menos efetiva, em qual fase do ciclo estral o desenvolvimento da doença é mais bem sucedido e em que fase do ciclo estral a resposta inflamatória e produção de citocinas é mais ou menos intensa.

Apesar das limitações, nosso estudo demonstrou que a resposta inflamatória em fêmeas foi mais acentuada que em machos, com diferença estatisticamente significativa para o predomínio de linfócitos na aracnoide e o aumento da IL-6 quando comparamos os encéfalos de ratos fêmeas e machos. Entretanto, embora o aumento de linfócitos na área periventricular e no plexo coroide não fossem significantes, eles também estavam aumentados quando comparados os grupos de fêmeas e machos, e na análise imunohistoquímica embora a IL-10 e IFN- γ também não tivessem aumento significativo, eles também estavam elevados quando comparamos os grupos de fêmeas e de machos

Conclusão

Conclusão

As reações inflamatórias da neurocisticercose extraparenquimatosa experimental em ratos fêmeas é mais intensa que em machos, com mais infiltrado leucocitário na região da aracnoide e maior concentração tecidual de IL-6.

Referências

Referências

1. Adalid-Peralta L, Rosas G, Arce-Sillas A, Bobes RJ, Cárdenas G, Hernández M, Trejo C, Meneses G, Hernández B, Estrada K, Fleury A, Laclette JP, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. Effect of Transforming Growth Factor- β upon *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* Cysticerci. *Sci Rep*. 2017; 7(1):12345.
2. AlvarezJI, MishraBB, GundraUM, MishraPK, TealeJM. *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 2010;137(3):359-372.
3. Alvarez JI, Teale JM. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol*. 2007; 187(1-2):102-113.
4. Alvarez JI, Teale JM. Evidence for differential changes of junctional complex proteins in murine neurocysticercosis dependent upon CNS vasculature. *Brain Res*. 2007; 1169:98- 111.
5. Alvarez JI, Teale JM. Multiple expression of matrix metalloproteinases in murine neurocysticercosis: Implications for leukocyte migration through multiple central nervous system barriers. *Brain Res*. 2008; 1214:145-158.
6. Ambrosio JR, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Ruíz-Rosado A Sánchez-Orellana PL, Reynoso- Ducoing O, Nava-Castro KE, Martínez- Velázquez N, Escobedo G, Ibarra-Coronado EG, Valverde-Islas L, Morales-Montor J. Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol*. 2014; 44(10):687–696.
7. Ambrosio JR, Valverde-Islas L, Nava-Castro KE, Palacios- Arreola MI, Ostoa-Saloma P, Reynoso-Ducoing O, et al. Androgens exert a cysticidal effect upon *Taenia crassiceps* by disrupting flame cell morphology and function. *PLoS One*. 2015;10(6): e0127928.
8. Arce-Sillas, A., Alvarez-Luquín, D., Cardenas, G., Casanova-Hernandez, D., Fragoso, G., Hernandez, M., Proano Narvaez, J., García-Vazquez, F., Fleury, A., Sciutto, E., 2016. Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clin. Exp. Immunol*. 183, 271–279.
9. Bazan R, Hamamoto Filho PT, Luvizutto GJ, Nunes HRC, Odashima NS, Santos AC, et al. Clinical symptoms, imaging features and cyst distribution in the cerebrospinal fluid compartments in patients with extraparenchymal neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(11): e0005115.
10. Bonato PS, Oliveira AR, Santana FJ, Fernandes BJ, Lanchote VL, Gonzalez AE, Garcia HH, Takayanagui OM. Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44(2):558-563.

11. Carpio A, Escobar A, Hauser WA (1998) Cysticercosis and epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 39: 1025-1040.
12. Cárdenas G, Carrillo-Meza R, Jung H, Sciutto E, Soto Hernandez JL, Fleury A. Subarachnoidal Neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series. *BMC Neurology* 2010; 10:16.
13. Cárdenas G, Fragoso G, Rosetti M, Uribe-Figueroa L, Rangel- Escareño C, Saenz B, Hernández M, Sciutto E, Fleury A. Neurocysticercosis: the effectiveness of the cysticidal treatment could be influenced by the host immunity. *Med Microbiol Immunol.* 2014; 203(6):373-381.
14. Cárdenas G, Guevara-Silva E, Romero F, Ugalde Y, Bonnet C, Fleury A, Sciutto E, Nunes CM, Soto- Hernández JL, Shankar SK, Mahadevan A. Spinal *Taenia solium* cysticercosis in Mexican and Indian patients: a comparison of 30-year experience in two neurological referral centers and review of literature. *Eur Spine J.* 2016;25(4):1073-1081.
15. Cárdenas G, Valdez R, Sáenz B, Bottasso O, Fragoso G, Sciutto E, Romano M C ,Fleury A. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol.* 2012; 42(2):171-176.
16. Carpio A, Fleury A, Romo ML, Abraham R. Neurocysticercosis: the good, the bad, and the missing. *Expert Rev Neurother.* 2018; 18(4):289-301.
17. Chavarría A, Fleur A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol.* 2005; 116(3):271-8.
18. Chernin J. The growth of the metacestodes of *Taenia crassiceps* in white mice. *J Helminthol.* 1975; 49(4):297-300.
19. de Aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 1988. 28: 6577.
20. Del Brutto OH, García E, Talámas O, Sotelo J. Sex- related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med.* 1988; 148(3):544-546.
21. Domínguez-Roldan R, Pérez-Martínez M, Rosetti MF, Arias-Hernández D, Bernal-Fernández G, Flores- Pérez FI, Hallal-Calleros C. High frequency of *Taenia pisiformis* metacestodes and high sex-associated susceptibility to cysticercosis in naturally infected wild rabbits. *Parasitol Res.* 2018; 117(7):2201-2206.
22. Fabiani S, Bruschi F. Neurocysticercosis in Europe: still a public health concern not only for imported cases. *Acta Trop.* 2013; 128(1):18-26.
23. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunol.* 2016; 38(3):147-157.

24. Fleury A, Carrillo Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(1):123-133.
25. Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104(4):243-50.
26. Fleury A, Gómez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarría A, Carrillo- Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003; 22(2):139-145.
27. Freeman, RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian J Zool.* 1962; 40(6): 969–990.
28. Gomez Y, Valdez RA, Larralde MC, Romano MC. Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps* cisticercus metabolizes exogenous androstenedione to testosterone *in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74(3):143–147.
29. Góngora-Rivera F, Soto-Hernandez JL, Guevara P, Sotelo-Morales J. In neurocysticercosis, csf cytokines correlate with cerebral blood flow velocities. *Neurology.* 2008; 71.
30. Griper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease a review. *ActaTrop.* 2017;166:218- 224.
31. Hamamoto Filho PT, Zanini MA, Botta FP, Rodrigues MV, Bazan R, Vulcano LC, Biondi GF. Development of an experimental model of neurocysticercosis- induced hydrocephalus. Pilot study. *Acta Cir Bras.* 2015; 30(12):819-823.
32. Hamamoto Filho PT, Fabro AT, Rodrigues MV, Bazan R, Vulcano LC, Biondi GF, et al. *Taenia crassiceps* injection into the subarachnoid space of rats simulates radiological and morphological features of racemose neurocysticercosis. *Childs Nerv Syst.* 2017; 33(1):119123.
33. Hamamoto Filho PT, Fogaroli MO, Oliveira MAC, Oliveira CC, Batah SS, Fabro AT, Vulcano LC, Bazan R, Zanini MA. A rat model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus: chronic progressive hydrocephalus with mild clinical impairment. *World Neurosurgery.* 2019. Ahead of print.
34. Hamamoto Filho PT, Singh G, Winkler AS, Carpio A, Fleury A. Could Differences in Infection Pressure Be Involved in Cysticercosis Heterogeneity? *Trends Parasitol.* 2020 Oct;36(10):826834.
35. Hamamoto Filho PT, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A. Inflammation in neurocysticercosis: clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021 Dec;19(12):1503-1518

36. Huerta L, Terrazas LI, Sciutto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol.* 1992; 78(3): 471–476.
37. Kelvin E A, Carpio A, Bagiella E, Leslie D, Leon P, Andrews H, Hauser WA. The association of host age and gender with inflammation around neurocysticercosis cysts. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009; 103(6):487- 499.
38. Laranjo- González M, Dvelesschauwer B, Trevisan C, Allepuz A, Sotiraki S, Abraham A, et al. Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe. *Parasit Vectos* 2017; 10(1):349.
39. Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 52(6):575-58.
40. Matos-Silva H, Reciputti BP, De Paula EC, Oliveira AL, Moura VBL, Vinaud MC, Oliveira MAP, Lino-Junior RS. Encefalite experimental causada por cisticercos de *Taenia crassiceps* em camundongos. *Arq Neuropsiquiatria.* 2012; 70(4): 287-292.
41. Milhomem AC, Souza AJS, Silva HM, Vinaud MC, Oliveira MAP, Machado JR, Lino Júnior RS. Histopathologic aspects of experimental cysticercosis and in situ cytokines profile in C57BL/6 mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2018; 76(5):339-345.
42. Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp Parasitol.* 2002; 100(4):209–216.
43. Morales J, Larralde C, Arteaga M, Govezensky T, Romano MC, Morali G. Inhibition of Sexual Behavior in Male Mice Infected with *Taenia crassiceps* Cysticerci. *The Journal of Parasitology.* 1996; 82(5): 689-693.
44. Morales J, Martinez JJ, Garcia-Castella J, Peña N, Maza V, Villalobos N, Aluja AS, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100(2):123–135.
45. Moura VBL, Milhomem AC, Lima SB, Matos-Silva H, Sugita DM, Vinaud MC, Lino-Junior RS. Desmielinização na neurocisticercose intraventricular experimental. *Arq. NeuroPsiquiatria.* 2020; 78(2).
46. Murrieta I, Flores X, Osorio R, Feher JK, Carrillo-Mezo, Fleury A. Natural history of extraparenchymal neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2021; 115: 1218-1225.
47. Naina Arora, Tripathi S, Sao R, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Molecular NeuroPathomechanism of Neurocysticercosis: How Host Genetic Factors Influence Disease Susceptibility. *Mol Neurobiol.* 2018; 55:1019–1025.

48. Nava-Castro K, Hernández-Bello R, Muñoz-Hernández S, Camacho- Arroyo I, Morales-Montor J. Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1262:16-26.
49. Nava-Castro KE, Pavón L, Becerril-Villanueva LE, Ponce-Regalado MD, Aguilar-Díaz H, Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. Sexual Dimorphism of the Neuroimmunoendocrine Response in the Spleen during a Helminth Infection: A New Role for na Old Player? *Pathogens.* 2022; 11: 308.
50. Rajshekhar V, Chandy MJ. Incidence of solitary cysticercus granulomas. In:Rajshekhar V, Chandy MJ, editors. *Solitary cysticercus granuloma.* Hyderabad,India: Orient Longman; 2000. p. 12–28.
51. Rangel R, Torres B, Del Brutto O, Sotelo J. Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 Mar;36(2):387- 92
52. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, et al. (2001) Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69: 45544560.
53. Romano MC, Jiménez P, Miranda-Brito C, Valdez RA. Parasites and steroid hormones: corticosteroid and sex steroid synthesis, their role in the parasite physiology and development. *Front Neurosci.* 2015; 9:224.
54. Sciutto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A. Human neurocysticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect.* 2013 Jun;15(6-7):524-30.
55. Singh G. Neurocysticercosis in South Central America and the Indian subcontinent. A comparative evaluation. *Arq Neuropsiquiatr.* 1997; 55(3A):349–356.
56. Singh SK, Prasad KN. Immunopathogenesis of Neurocysticercosis: Role of Cytokines. *Immunome Res.* 2015; 11: 96.
57. Sotelo J. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011; 11(6):529-535.
58. Toledo A, Osorio R, Matus C, Lopez YM, Cruz NR, Sciutto E, Fragoso G, Arauz A, CarilloMezo R, Fleury A. Human Extraparenchymal Neurocysticercosis: The Control of Inflammation Favors the Host...but Also the Parasite. *Front Immunol.* 2018; 9:2652.
59. Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, León-Nava MA, Escobedo G, Morales-Montor J. Tamoxifen treatment induces protection in murine cysticercosis. *J Parasitol.* 2007; 93(6):1512–1517.

60. White-Jr AC, Coyle CM, Rajshekhar V, Singh G, Hauser WA, Mohanty A, et al. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis: 2017 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Clin Infect Dis. 2018; 66(8):1159-1163.
61. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol. 1966; 30(1):23-38.
62. Willms K, Zurabian R. Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models. Parasitology. 2010;137(3):335-346.

Anexo – Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1318/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"O sexo é um fator determinante de diferenças morfológicas e inflamatórias na neurocisticercose extraparenquimatosa experimental"**, conduzido pela Pesquisador: **Carlos Alexandre Aguiar Moreira – Orientador: Prof. Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho** – registrada com o **nº 1318/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 29 janeiro de 2020.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01 de abril de 2022	
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Wistar	
Nº de animais	72	
Idade/Peso	21 Dias – 50gramas	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central	



Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br