



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

**Pedro Tadao Hamamoto Filho**

**Estudo das alterações comportamentais,  
radiológicas e morfológicas da hidrocefalia induzida  
por neurocisticercose experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia – Exame Geral de Qualificação

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zanini

Botucatu  
2019

Pedro Tadao Hamamoto Filho

Estudo das alterações comportamentais, radiológicas e  
morfológicas da hidrocefalia induzida por  
neurocisticercose experimental

Tese apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título  
de Doutor em Bases Gerais da  
Cirurgia

Orientador: Prof.Dr. Marco Antônio Zanini

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Hamamoto Filho, Pedro Tadao.

Estudo das alterações comportamentais, radiológicas e morfológicas da hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental / Pedro Tadao Hamamoto Filho. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marco Antônio Zanini

Capes: 40102084

1. Hidrocefalia. 2. Estudos experimentais. 3. Cisticercose cerebrosinal. 4. *Taenia*.

Palavras-chave: Hidrocefalia; Modelo experimental; Neurocisticercose; *Taenia crassiceps*.

# *Dedicatória*

*A Deus,*

*criador de todas as coisas, princípio e fim, razão e inspiração da  
existência.*

*À Ana Beatriz,*

*minha filha, minha riqueza e alegria, meu desafio de ser pai e ensinar a  
ser, pensar, sentir e viver.*

*À Faculdade de Medicina de Botucatu,  
na memória dos professores*

*Mário Rubens Guimarães Montenegro,  
pioneiro da casa que me fez médico*

*e Armando Alves, pioneiro da Neurocirurgia  
na escola que me fez neurocirurgião*

## **Agradecimentos**

À minha esposa Juliana Fattori Hamamoto, pelo amor, amizade, companheirismo e incentivo, pela alegria de compartilhar sonhos, pelo sorriso que consola e estimula.

Ao professor Marco Antônio Zanini, meu mestre, que ensina com palavras e com exemplo, com técnica cirúrgica e bom senso; e pelo grande incentivo que me dá para crescer profissionalmente.

À minha mãe Alice Hamamoto, que me ensinou caráter, que me corrigiu e incentivou em todos os momentos da vida, que me ensinou a servir a Deus; em nome de quem agradeço a todos os familiares.

Ao professor Rodrigo Bazan, pela amizade e incentivo para o crescimento e desenvolvimento científico.

Ao professor Germano Francisco Biondi, que me confiou as cepas de *Taenia crassiceps*, permitindo a criação de uma linha de pesquisa.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental que ajudaram em diversos momentos do trabalho: Diego Generoso, José Antônio Germiniano, Luiz Carlos Bardella, Leandro dos Santos, José Lucas Carvalho (*in memoriam*), Vickeline Namba, Renata Capela, Ana Paula Dória, Maria Regina Moretto.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu, nas pessoas do Prof. Luiz Carlos Vulcano e Heraldo André Catalan Rosa.

Ao professor Paulo Sérgio de Almeida Pinto, da Universidade Federal de Viçosa, por ceder novas cepas para manutenção de *Taenia crassiceps*.

Ao Dr. Alexandre Todorovic Fabro, Dr. Cristiano Claudino Oliveira e aluna Sabrina Setembro Batah, pelo auxílio nas avaliações histológicas.

Aos alunos Marcelo Ortolani Fogaroli e Marcelo Augusto Chiantelli de Oliveira pelo auxílio nos procedimentos experimentais.

## Epígrafe

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

## Resumo

A hidrocefalia é uma das complicações mais frequentes da neurocisticercose extraparenquimatosa, combinando mecanismos obstrutivos e inflamatórios que causam prejuízos à circulação de líquido. Modelos experimentais podem auxiliar na compreensão de mecanismos fisiopatológicos da doença. Estudamos alterações comportamentais, radiológicas e morfológicas de ratos num modelo experimental de hidrocefalia induzida por neurocisticercose através da inoculação cisternal de cistos e antígenos de *Taenia crassiceps* comparando-o com o modelo clássico de hidrocefalia experimental induzida por caulim. Foram utilizados 52 animais divididos em quatro grupos: cistos, antígenos, caulim e controle. Para avaliação comportamental foi utilizado teste de campo aberto; para avaliação radiológica foram adquiridas imagens de ressonância magnética com estudo de volume ventricular; e para avaliação morfológica foram analisadas figuras de inflamação e expressão imunohistoquímica de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e aquaporina-4 (AQP-4). Diferentemente do que ocorre na hidrocefalia por caulim, o comportamento dos animais com hidrocefalia por neurocisticercose não foi alterado precocemente ( $p = 0,02$ ). O volume ventricular da hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental teve evolução progressiva e as alterações de ressonância magnética foram semelhantes às observadas em humanos. A hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental induz reações inflamatórias e astrocitárias periventriculares. A expressão de GFAP foi maior no primeiro mês pós-inoculação que no sexto mês ( $p = 0,04$ ). A expressão de AQP-4 foi maior no sexto mês pós-inoculação que no primeiro mês ( $p = 0,02$ ) e também ocorreu em animais que receberam inoculação antigênica mas não desenvolveram hidrocefalia, sugerindo um papel da AQP-4 como via alternativa de absorção de líquido em vigência de inflamação.

## **Abstract**

Hydrocephalus is one of the most common complications of extraparenchymal neurocysticercosis, combining obstructive and inflammatory mechanisms that impair the circulation of cerebrospinal fluid. Experimental models are helpful for the understanding of the pathophysiological mechanisms of the disease. We studied behavioral, radiological and morphological alterations of rats in an experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus through a cisternal inoculation of cysts and antigens of *Taenia crassiceps*, comparing it with the classic model of experimental kaolin-induced hydrocephalus. We used 52 animals divided into four groups: cysts, antigens, kaolin and control. Open field test was used for behavioral assessment; magnetic resonance imaging (MRI) with ventricular volume study was used for radiological assessment; morphological evaluation focused on figures of inflammation and immunohistochemical reactivity of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and aquaporin-4 (AQP-4). Differently from the kaolin-induced hydrocephalus, the behavior of the animals with hydrocephalus by neurocysticercosis was not altered early ( $p = 0.02$ ). The ventricular volume of hydrocephalus induced by experimental neurocysticercosis had a progressive evolution and the MRI changes were similar to those observed in humans. Hydrocephalus induced by experimental neurocysticercosis induces periventricular inflammatory and astrocytic reactions. GFAP expression was higher in the first month after inoculation than in the sixth month ( $p = 0.04$ ). AQP-4 expression was higher in the sixth month post-inoculation than in the first month ( $p = 0.02$ ), and also occurred in animals that received antigen inoculation but did not develop hydrocephalus, suggesting a role of AQP-4 as an alternative route of CSF absorption in the presence of inflammation.



## Lista de ilustrações

- Figura 1. Paciente com neurocisticercose extraparenquimatosa.
- Figura 2. Paciente com neurocisticercose parenquimatosa.
- Figura 3. Representação da endemicidade de *T. solium* no mundo.
- Figura 4. Distribuição de cistos de neurocisticercose.
- Figura 5. Cisto localizado no quarto ventrículo obstruindo a circulação de líquido.
- Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental.
- Figura 7. Retirada de cistos de *T. crassiceps* retirados da cavidade peritoneal de camundongo e seleção em placa de Petri de cistos viáveis.
- Figura 8. Teste de campo aberto.
- Figura 9. Representação tridimensional do volume ventricular gerada pelo software ITK-SNAP.
- Figura 10. Ressonância magnética ilustrativa do padrão de dilatação ventricular dos grupos experimentais no primeiro mês após as inoculações.
- Figura 11. Ressonância magnética ilustrativa do padrão de dilatação ventricular dos animais dos grupos experimentais mantidos vivos até o sexto mês após as inoculações.
- Figura 12. Ressonância magnética de animais do grupo cistos mostrando o padrão de distribuição de cistos nos espaços liquóricos.
- Figura 13. Aspecto macroscópico do encéfalo de animais inoculados com cistos.
- Figura 14. Painel de alterações histológicas nos grupos experimentais mostra astrogliose reativa nos grupos cistos, antígenos e caulim.
- Figura 15. Painel de reatividade imunistoquímica de GFAP e AQP-4.
- Gráfico 1: variação do peso dos animais ao longo do período de observação, de acordo com os grupos.
- Gráfico 2. Porcentagem de área periventricular com gliose, de acordo com grupos.
- Gráfico 3. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico periventricular.
- Gráfico 4. Área de edema do plexo coroide mensurada pela área do plexo coroide.
- Gráfico 5. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico no plexo coroide.
- Gráfico 6. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico na região subependimária.
- Gráfico 7. Quantificação de células GFAP+ na região periventricular.
- Gráfico 8. Quantificação de células AQP-4+ na região periventricular, subgrupos 1 vs 6 meses.
- Gráfico 9. Quantificação de células GFAP+ na região periventricular.
- Gráfico 10. Quantificação de células AQP-4+ na região periventricular, subgrupos 1 vs 6 meses.

## **Lista de tabelas**

Tabela 1: Média dos parâmetros do teste comportamental ao final do primeiro mês de observação, por grupos.

Tabela 2: Média dos parâmetros do teste comportamental ao final de seis meses de observação, por grupos.

Tabela 3: Volume ventricular médio dos grupos experimentais no primeiro e no sexto mês pós-inoculação.

Tabela 4: Distribuição de cistos intracranianos entre os animais inoculados com cistos de *Taenia crassiceps*, após um mês de inoculação, apresentados em ordem crescente de acordo com o volume ventricular.

Tabela 5: Distribuição de cistos intracranianos entre os animais inoculados com cistos de *Taenia crassiceps*, após seis meses de inoculação, apresentados em ordem crescente de acordo com o volume ventricular.

Tabela 6. Valor de R para correlações testadas entre parâmetros de peso, comportamento, volume ventricular e expressão de GFAP e AQP-4.

## Lista de abreviaturas e siglas

Ag: grupo antígenos

AQP-1: aquaporina-1

AQP-4: aquaporina-4

BALB/c: camundongo albino

BHE: barreira hemato-encefálica

C57BL/6: camundongo negro

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CISS: *constructive interference in steady state* (interferência construtiva no estado estacionário)

Ctrl: grupo controle

DAB: diaminobenzina

DVP: derivação ventricular para o peritônio

FIESTA: *fast imaging employing steady-state acquisition* (imagem rápida usando estado estacionário)

GFAP: *glial fibrillar acid protein* (proteína ácida fibrilar glial)

HCFMB: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

HRP: peroxidase *horseradish* (peroxidase de rábano)

IHQ: imunoistoquímica

ko: *knock-out* (nocaute)

*M. corti: Mesocostoides corti*

RM: ressonância magnética

rpm: rotações por minuto

SNC: sistema nervoso central

STAT: *signal transducer and activator transcription* (transdutor de sinal e ativador de transcrição)

*T. crassiceps: Taenia crassiceps*

*T. solium: Taenia solium*

TBST: mistura de soro fisiológico tamponado com tris e polisorbato

Th: célula T *helper*

## Lista de símbolos

%: porcentagem

cm: centímetro

G: gauge

g: grama

kg: quilograma

mg: miligrama

ml: mililitro

mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico

n<sub>i</sub>: tamanho da amostra inicial

n<sub>t</sub>: tamanho da amostra total

s: segundo

μm: micrômetro

## Sumário

Prólogo .....	14
1. Introdução .....	17
1.1. Neurocisticercose – ainda prevalente, porém negligenciada .....	20
1.2. Neurocisticercose extraparenquimatosa – forma mais agressiva da doença.....	22
1.3. Hidrocefalia na neurocisticercose.....	25
1.4. Tratamento cirúrgico da hidrocefalia na neurocisticercose.....	28
1.5. Reprodução laboratorial da doença – modelos experimentais de neurocisticercose.....	31
1.6. Modelos experimentais de hidrocefalia.....	34
1.7. Fisiopatologia da hidrocefalia – perspectivas recentes.....	36
2. Justificativa .....	39
3. Objetivo .....	40
4. Materiais e métodos .....	41
4.1. Cálculo do tamanho amostral.....	41
4.2. Delineamento experimental.....	42
4.3. Parasitas e inoculações.....	43
4.4. Estudo comportamental.....	45
4.5. Avaliação radiológica.....	46
4.6. Análise morfológica.....	47
4.7. Análise estatística.....	49
5. Resultados .....	50
5.1. Variação de peso.....	50
5.2. Alterações comportamentais.....	52
5.3. Alterações radiológicas.....	53
5.4. Alterações morfológicas.....	58
5.5. Correlação entre parâmetros.....	66
6. Discussão .....	67
7. Conclusões .....	78
8. Referências .....	79
Epílogo –	
A Neurocisticercose na Faculdade de Medicina de Botucatu.....	91
9. Artigo científico em inglês .....	93
10. Comprovante de aprovação do projeto científico no CEUA .....	110

## **Prólogo**

Sexta-feira, 09/11/2018: esta tese estava praticamente pronta. Dá entrada no Pronto Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) uma paciente do sexo feminino, de 53 anos, natural de Saloá/Pernambuco, encaminhada com história de cinco meses de cefaleia progressiva, com piora aguda há seis dias, acompanhada de vômitos e perda súbita e transitória de consciência. Ressonância magnética do encéfalo mostrou lesão cística no forame de Monro causando dilatação ventricular assimétrica (figura 1A), mais importante à direita, além de outra lesão vesicular no córtex parietal direito e outras lesões calcificadas em outras topografias do cérebro. Foi levantada hipótese diagnóstica de neurocisticercose e programada retirada da lesão intraventricular. No final de semana a paciente apresentou rebaixamento do nível de consciência e o neurocirurgião de plantão optou por realizar derivação ventricular externa e fenestração endoscópica do septo pelúcido (figura 1B). Optou por não retirar o cisto por julgar haver sinais radiológicos de aderência do cisto à parede ventricular. No decorrer da semana, a paciente foi submetida a ressecção do cisto com microcirurgia através de acesso inter-hemisférico transcaloso (figuras 1C, 1D). A derivação ventricular pôde ser retirada e a paciente iniciou, então, tratamento com Albendazol e mantém acompanhamento regular no serviço de Neurocirurgia do HCFMB.

Segunda-feira, 19/11/2018, chega ao Pronto Socorro um paciente do sexo masculino, de 34 anos, natural de Jaicós/Piauí, com quadro de crises epiléticas focais motoras com generalização secundária iniciadas há onze dias. Tomografia computadorizada e ressonância magnética de encéfalo mostraram múltiplas lesões císticas com sinal heterogêneo no interior (figura 2) sugestivas de

neurocisticercose. O paciente iniciou, então, tratamento anti-epilético de manutenção, além de tratamento cisticida com Albendazol e Praziquantel acompanhados de corticoesteróide, sem intercorrências durante a internação hospitalar. O paciente mantém acompanhamento no serviço de Neurologia do HCFMB.

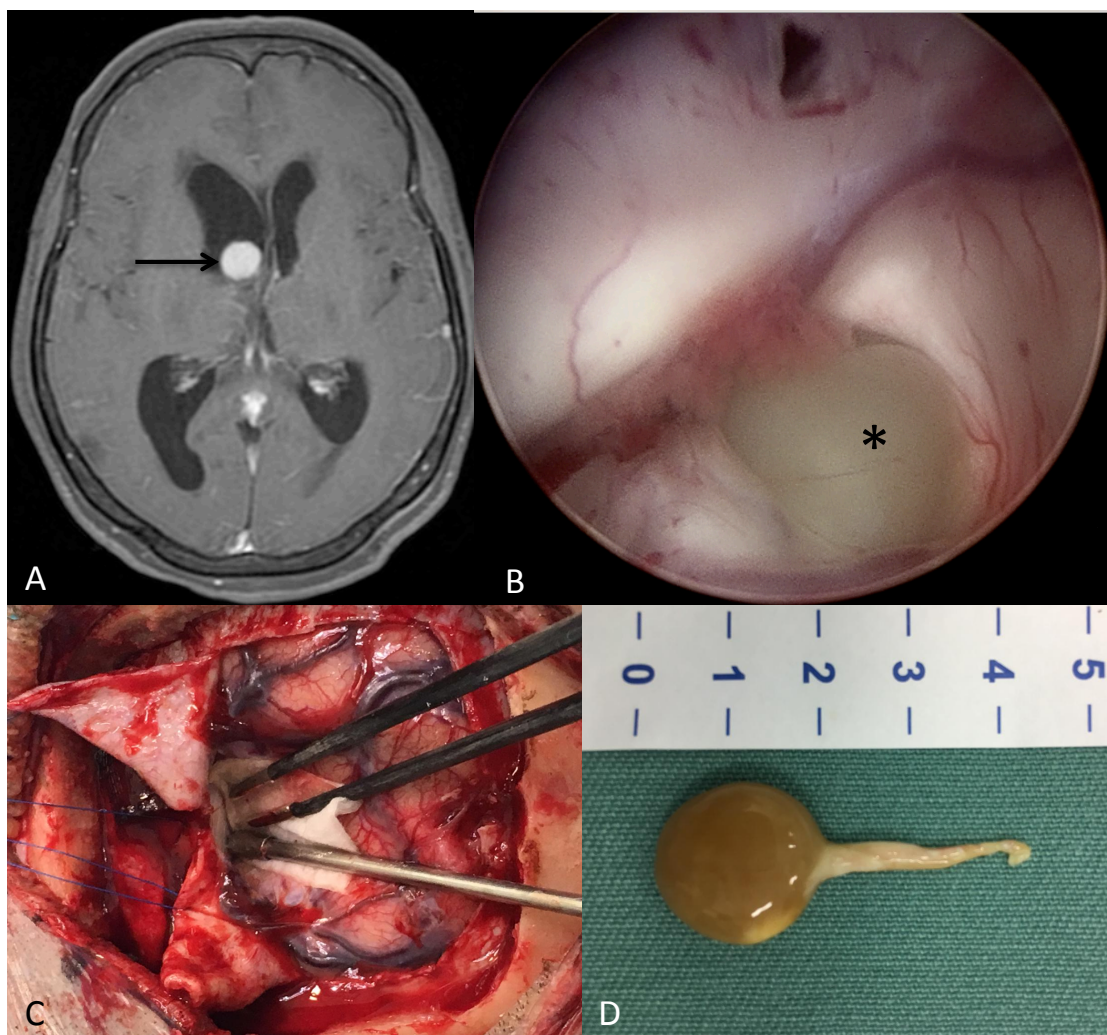


Figura 1. Paciente com neurocisticercose extraparenquimatosa. A: imagem de ressonância magnética ponderada em T1 com contraste mostra cisto intraventricular (seta) causando obstrução hidrocefalia por obstrução do forame de Monro à direita. B: Visão endoscópica do cisto (\*). C: acesso inter-hemisférico utilizado para retirada do cisto apresentado em (D).

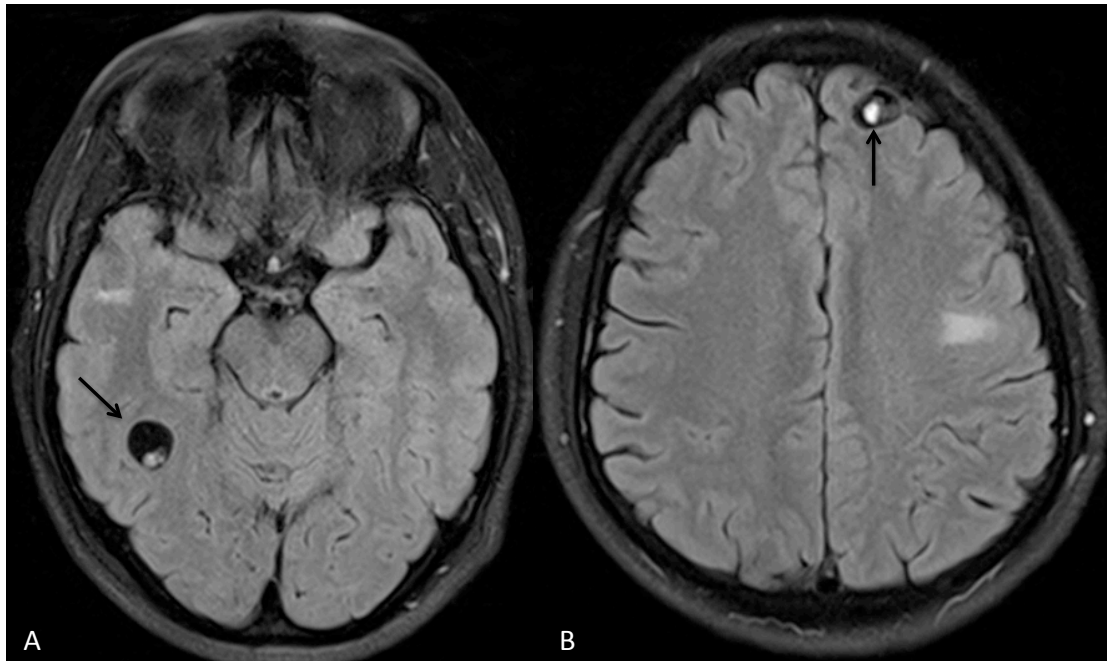


Figura 2. Paciente com neurocisticercose parenquimatosa. Imagens de ressonância ponderadas em FLAIR exibem lesões vesiculares císticas hipointensas com conteúdo hiperintenso sugestivo de escólex de cisticercos (setas) no lobo temporal direito (A) e frontal esquerdo (B).

Os dois casos representam as distintas formas de neurocisticercose (extraparenquimatosa e parenquimatosa, respectivamente) e ilustram o quadro clínico comum à essas duas formas da doença: hidrocefalia com hipertensão intracraniana na forma extraparenquimatosa, e epilepsia na forma parenquimatosa. Os dois pacientes residem na região de Botucatu, mas são provenientes da região Nordeste do país, o que demonstra que a doença ainda é prevalente no país, especialmente em áreas sem saneamento adequado. Oportunamente, os dois casos apresentam a pertinência do estudo da doença.



# **Estudo das alterações comportamentais, radiológicas e morfológicas da hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental**

## **1. Introdução**

Neurocisticercose é a doença parasitária mais comum do sistema nervoso central (SNC). Trata-se de zoonose passível de erradicação através de medidas de controle sanitário que interrompam o ciclo biológico do parasita, *Taenia solium*, mas que permanece endêmica em países em desenvolvimento e tem ressurgido em países desenvolvidos (Gripper e Welburn, 2017; Carpio et al., 2018).

*Taenia solium* é um cestodo parasita de vertebrados que tem como hospedeiro definitivo o homem, e como hospedeiro intermediário, o porco. No ciclo de vida do parasita, o verme adulto se localiza no intestino humano, onde se reproduz por autofecundação. Seus ovos são liberados nas proglótides da porção caudal do parasita e exteriorizados para o meio ambiente através das fezes do hospedeiro. No ambiente, os ovos de *T. solium* são ingeridos por porcos. Na mucosa intestinal dos suínos, os ovos eclodem e os zigotos se transformam em oncosferas que atravessam a mucosa intestinal e se alojam na musculatura do animal na forma de cisticercos. A ingestão de carne suína contaminada com cisticercos permite o desenvolvimento da forma adulta do parasita no intestino humano, fechando seu ciclo biológico. Quando o homem ingere os ovos do parasita, comporta-se como hospedeiro intermediário acidental e, sob essa circunstância, as oncosferas ativadas têm predileção por se alojar no SNC, causando a neurocisticercose. No SNC, os cisticercos podem se alojar no parênquima cerebral, no espaço subaracnoideo e nos ventrículos cerebrais. A

localização, o tamanho dos cistos, a carga parasitária e as reações imunológicas do hospedeiro determinam a sintomatologia (Coyle et al., 2012; Oliveira et al., 2018).

A forma parenquimatosa é a mais frequente e está associada a crises epiléticas, cefaleia, déficits focais e alterações comportamentais (Garcia et al. 2014). No parênquima cerebral, o cisticercos passa por quatro formas evolutivas: vesicular, coloidal, granulomatosa e calcificada. Na forma vesicular, o parasita é viável e exibe mecanismos adaptativos de proteção contra a resposta imunológica do indivíduo. Em exames de imagem, identificam-se lesões císticas hipoatenuantes em relação ao parênquima, sem realce a contraste. Na forma coloidal, há resposta inflamatória contra o parasita, que passa a exibir conteúdo cístico viscoso, com fino realce periférico ao contraste. O prosseguimento da degeneração do parasita evolui para a formação de granuloma, com macrófagos produzindo uma reação de corpo estranho que se mostra em exames de imagem como cistos com espessa parede de intensa captação de contraste. Finalmente, a resposta inflamatória se organiza formando uma lesão calcificada (Kimura-Hayama et al., 2010).

A forma parenquimatosa é passível de tratamento clínico com as drogas utilizadas para o tratamento da teníase intestinal, como Albendazol e Praziquantel. Essas drogas têm indicação nas fases evolutivas iniciais da doença e são efetivas na destruição do parasita. Corticoesteróides devem ser administrados concomitantemente para reduzir os efeitos da intensa resposta inflamatória provocada pela morte do parasita que pode deteriorar os sintomas clínicos. Além disso, drogas anti-epiléticas também devem ser utilizadas nos casos de epilepsia associada (White Jr et al., 2018).

A forma extraparenquimatosa é a forma menos frequente, porém mais grave da doença. Os cistos se alojam nos compartimentos liquóricos (espaço subaracnoideo e ventrículos) podendo causar obstrução mecânica à circulação do líquido e hidrocefalia, meningite, compressão de nervos cranianos, e reação inflamatória perivascular, determinando vasculite e consequentes infartos cerebrais (Fleury et al., 2011; Mahale et al., 2015). Tanto a obstrução mecânica quanto as reações inflamatórias na aracnoide podem ocasionar distúrbios da circulação do líquido e, conseqüentemente, hidrocefalia, uma das complicações mais frequentemente associadas à forma extraparenquimatosa da neurocisticercose (Sotelo e Marin, 1987; Matushita et al., 2011).

A hidrocefalia na neurocisticercose tem particularidades em relação às outras formas de hidrocefalia. Primeiramente, pela combinação de mecanismos mecânicos e inflamatórios em sua fisiopatologia; em segundo lugar, pela variabilidade do quadro clínico, que pode ser agudo ou crônico; e finalmente, pelos desafios que impõe ao tratamento cirúrgico (Colli et al., 2002). A hidrocefalia é classicamente tratada com derivações ventriculares para o peritônio (DVP). Na neurocisticercose, as DVPs têm risco aumentado de infecção e disfunção, aumentando o número de reoperações necessárias, as quais estão associadas a maiores taxas de morbi-mortalidade (Agapejev et al., 2007). O tratamento endoscópico da hidrocefalia, com a realização de terceiroventriculostomia, que comunica o sistema ventricular com o espaço subaracnoideo, ampliou as possibilidades terapêuticas para pacientes com hidrocefalia associada a neurocisticercose, porém não é efetiva em todos os casos, principalmente naqueles com intensa aracnoidite basal (Torres-Corzo et al., 2010; Zymberg, 2013; Zheyne et al., 2017).

### 1.1. Neurocisticercose – ainda prevalente, porém negligenciada

A neurocisticercose é uma doença relacionada a precariedade de condições sanitárias. Sua frequência reduziu muito ao longo do século XX em países desenvolvidos, notavelmente do hemisfério norte, porém permanece endêmica nos países em desenvolvimento, principalmente na América Latina, África sub-saariana, e no sudeste asiático (figura 3).

No Brasil, levantamentos até o início dos anos 2000 mostravam alta incidência da doença, com prevalência de 1,5% em estudos necroscópicos e de 3,0% em estudos clínicos, com mortalidade da doença próxima de 15% (Takayanagui et al., 1996; Chimelli et al., 1998; Agapejev, 2003). Apesar da redução da incidência da doença, a soro-prevalência do complexo teníase-cisticercose continua bastante elevada, na ordem de 3,4 a 13,8%, especialmente entre suinocultores domésticos – o que demonstra o potencial de surgimento de novos casos de neurocisticercose (Ishida et al., 2011; Guarda et al., 2018).

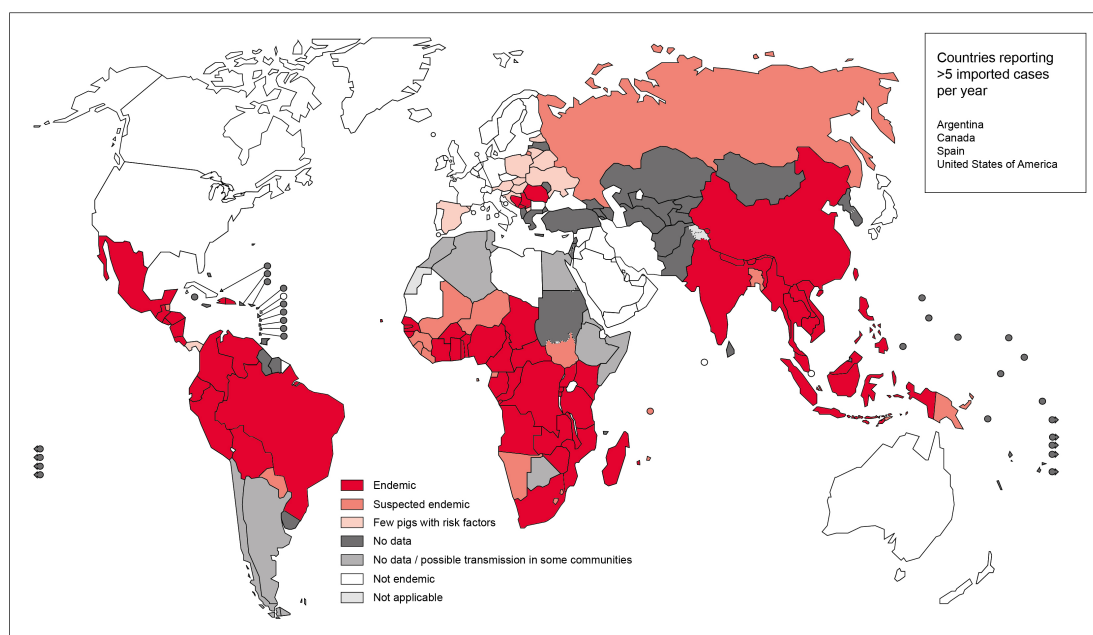


Figura 3. Representação da endemidade de *T. solium* no mundo. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2015

Recentemente, verificou-se que a neurocisticercose foi a causa de 0,015% dos óbitos no país, com taxa de mortalidade ajustada para idade de 0,97 por 1.000.000 de habitantes. Felizmente, há uma tendência na redução da mortalidade associada à doença, embora seus números ainda sejam preocupantes (Martins-Melo et al., 2016).

Na América Latina, a prevalência de neurocisticercose também tem se reduzido, porém persiste elevada (Flisser et al., 2003; Fleury et al., 2010; Fleury et al., 2014; Rodríguez-Morales et al., 2018). Dados consistentes de países como Peru e México demonstram soro-prevalência de 8,4% a 36,9% (Moyano et al., 2016; Morales et al., 2018), mantendo a neurocisticercose como importante causa de hospitalização em serviços de neurologia e neurocirurgia (Fleury et al., 2010; Ron-Garrido et al., 2015), e acarretando elevados custos financeiros (Bhattarai et al., 2018). Assim como ocorre no Brasil, a prevalência é mais alta entre habitantes de zona rural que convivem com a criação de suínos (Garvey et al., 2018).

Os dados epidemiológicos da África e do sudeste asiático são mais escassos, mas também apontam altas soroprevalências e achados característicos da doença em exames de neuroimagem, da ordem de 2 a 35% (Mwanjali et al., 2013; Mwape et al., 2015; Wu et al., 2017), causando também grande impacto social e econômico (Singh et al., 2017).

Na Europa e nos Estados Unidos, a doença tem reaparecido nas duas últimas décadas, principalmente em razão de fluxos migratórios a partir de países endêmicos (Giménez-Roldán et al., 2003; Walin e Kurtzke, 2004; Fabiani e Bruschi, 2013; Laranjo-González et al., 2017). Além disso, ainda existem condições para o surgimento de casos autóctones e transmissão no leste europeu

(Devleeschauwer et al., 2017) e nos próprios Estados Unidos (Sorvillo et al., 2011; Cantey et al., 2014). As ondas migratórias e as crises de refugiados são grandes desafios aos países desenvolvidos sob vários aspectos, incluindo aspectos sanitários e de saúde pública. Neste contexto, a neurocisticercose volta a ser um diagnóstico diferencial para doenças do sistema nervoso central em grandes centros (Hotez, 2014; O'Neal e Flecker, 2015; Herrador et al., 2018; Hunter et al., 2018; Nash et al., 2018).

### ***1.2. Neurocisticercose extraparenquimatosa - forma mais agressiva da doença***

A forma extraparenquimatosa da neurocisticercose é a menos comum, porém mais agressiva da doença (Estañol et al., 1986). A definição da forma extraparenquimatosa é bastante ampla: contempla cistos localizados nas cisternas da base do crânio, na fissura lateral do cérebro, nos ventrículos, no espaço subaracnoideo da convexidade e da medula espinhal (figura 4). Em comum a todas essas topografias, está o fato de os cistos se situarem em compartimentos líquóricos. Os cistos localizados no espaço subaracnoideo na alta convexidade cerebral têm comportamento biológico semelhante aos cistos parenquimais (Fleury et al., 2011). Já nas outras localizações, o quadro clínico é variável, e a evolução pode não ser tão favorável.

Enquanto os cistos estão viáveis e conseguem estabelecer mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, os pacientes podem permanecer assintomáticos por longo período (Cuetter e Andrews, 2002). Porém os cistos

nos compartimentos liquóricos podem absorver líquido, crescer e atingir grandes volumes, resultando em compressão de estruturas adjacentes. Esse fenômeno é chamado degeneração hidrópica e está envolvido na transformação do cisticerco da forma celulosa para a forma racemosa (Escobar, 1983). Na forma racemosa, em geral, os escólices estão ausentes e os cistos podem se aglomerar apresentando uma morfologia semelhante a cachos de uvas (Lerner et al., 2012).

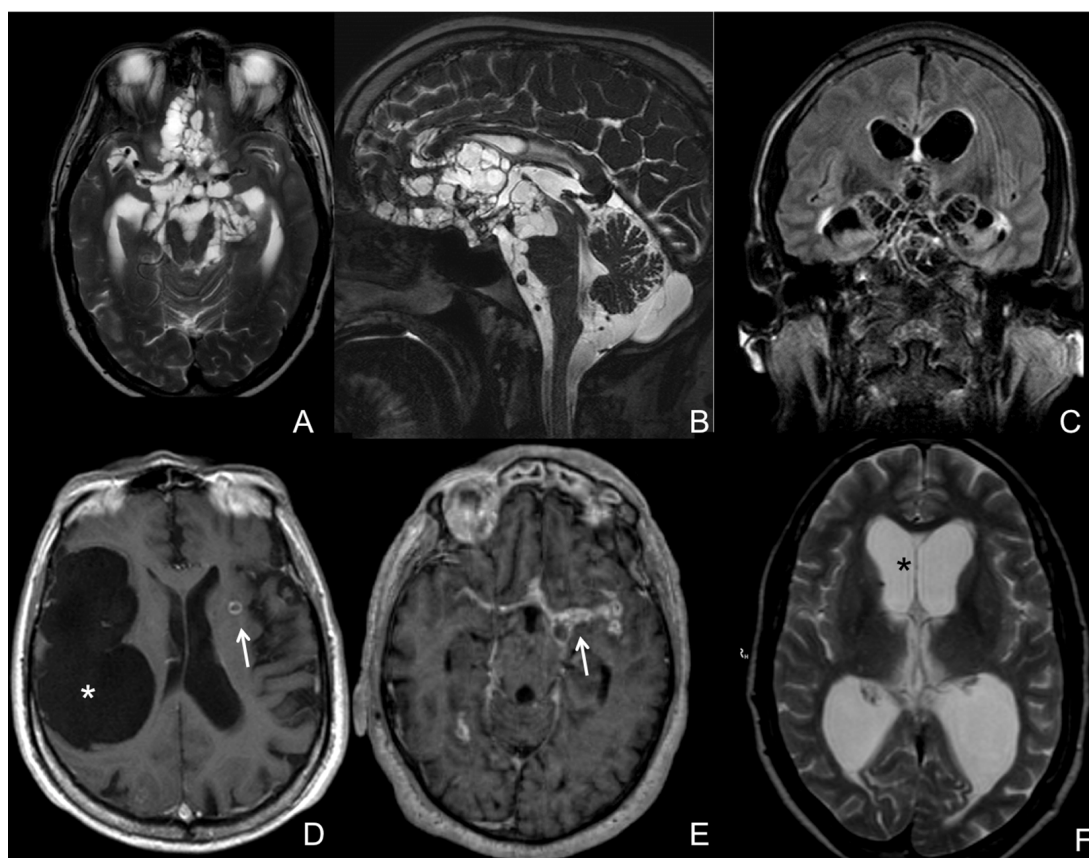


Figura 4. Distribuição de cistos de neurocisticercose. Lesões semelhantes a cachos de uvas nas cisternas basais são evidentes em cortes axiais (A) e sagitais (B) em T2. C: corte axial em FLAIR do mesmo paciente, mostrando lesões nas fissuras Sylvianas e inter-hemisféricas, bem como cisternas basais. D: T1, cisto gigante (\*) na fissura Sylviana à direita e um cisto parenquimal (seta). E: corte axial em T1, evidenciando captação de contraste nas fissuras Sylvianas (seta), principalmente à esquerda, que está associada a intensas reações inflamatórias decorrentes de cistos degenerados. F: T2, alargamento do ventrículo (\*) em paciente com hidrocefalia associada à neurocisticercose. Fonte: Bazan R, Hamamoto Filho PT, Luvizutto GJ et al. PLoS Negl Trop Dis, 2016.

A contínua liberação de antígenos pelo parasita provoca reações inflamatórias mediadas por diferentes respostas imunológicas. As camadas mais superficiais do tegumento do cisto têm antígenos diferentes das camadas mais profundas. Assim, a resposta imunológica inicial é diferente da resposta imunológica tardia. Esse mecanismo de liberação de diferentes antígenos pelo parasita acaba funcionando como mecanismo de evasão à resposta imune. Quando ocorre a destruição dos cistos, há liberação de várias frações antigênicas, causando intensas reações inflamatórias relacionadas ao surgimento de diferentes sintomas (Klesidis e Tsiodras, 2012). As reações inflamatórias podem causar meningite (Cárdenas et al., 2010), vasculite com conseqüente acidente vascular cerebral (Barrinagarrementeria e Cantú, 1998), comprometimento de nervos cranianos e nervos espinais (Bazan et al., 2016) e aracnoidite reacional, com conseqüente desenvolvimento de hidrocefalia (Figuroa et al., 2011). Hipertensão intracraniana pode ocorrer devido à própria hidrocefalia ou ao aumento da celularidade e concentração proteica no líquido (Bazan et al., 2015; Marcin-Sierra et al., 2017).

O diagnóstico por imagem da neurocisticercose extraparenquimatosa é mais difícil que o da forma parenquimatosa. Cistos no espaço subaracnoideo podem ser isodensos em relação ao líquido em exames de tomografia computadorizada e as seqüências básicas de ressonância magnética podem não ter sensibilidade suficiente para detectar os cistos. O uso de novas seqüências tridimensionais na ressonância magnética (CISS – *constructive interference in steady state*, FIESTA – *fast imaging employing steady-state acquisition*) aumentou a sensibilidade para casos de neurocisticercose extraparenquimatosa (Carrillo-Mezo et al., 2015), porém não estão disponíveis na rotina de exames de imagem



de muitos serviços.

Com relação ao tratamento, a forma extraparenquimatosa é também mais desafiadora. Na forma parenquimatosa, está bem estabelecido que as drogas anti-helmínticas são efetivas para destruição do parasita, e, possivelmente, permitem o controle de crises epiléticas, melhorando o prognóstico dos pacientes (Garcia et al., 2004; Singh e Sharma, 2017). Já na forma extraparenquimatosa, o tratamento antiparasitário é controverso (Carpio et al., 2018). Enquanto alguns estudos mostraram efetividade do albendazol contra cistos subaracnoideos e intraventriculares (Proaño et al., 2001; Göngora-Rivera et al., 2006), outros trabalhos alertam para o risco de exacerbação da resposta inflamatória e desenvolvimento de hidrocefalia aguda (García et al., 2002; DeGiorgio et al., 2002).

### ***1.3. Hidrocefalia na neurocisticercose***

A hidrocefalia é uma das afecções mais comuns da prática neurocirúrgica, com incidências que variam de 79 a 123 por 100.000 nascidos e com 400.000 casos novos por ano (Dewan et al., 2018). Trata-se de um desequilíbrio entre a produção, circulação e absorção do líquido. O conceito clássico da fisiologia do líquido e da fisiopatologia da hidrocefalia tem sido revisto nos últimos anos, incorporando conceitos de pulsação cerebral, complacência do parênquima e mecanismos moleculares de transporte de água (Kahle et al., 2016). De qualquer forma, a hidrocefalia pode ser causada por qualquer lesão estrutural ao sistema nervoso central, como malformações, neoplasias, doenças vasculares, trauma e infecções (Muir et al., 2016).

A hidrocefalia pode ocorrer em de 16 a 51% dos pacientes com neurocisticercose (Estañol et al., 1986; Wallin e Kurtzke, 2004). Entre pacientes com a forma extraparenquimatosa, a frequência de hidrocefalia é ainda maior, acometendo de 64 a 72% dos pacientes (Figuroa et al., 2011; Marcin-Sierra et al., 2017).

Classicamente, a hidrocefalia pode ser classificada como obstrutiva ou comunicante. Na hidrocefalia obstrutiva, há uma lesão estrutural no sistema ventricular que impede a circulação do líquido pelos ventrículos. Na hidrocefalia comunicante, há aumento da resistência à circulação de líquido nas cisternas basais ou à sua absorção pelas granulações aracnóideas (Scarff, 1963). Na neurocisticercose, os dois mecanismos podem estar envolvidos com o desenvolvimento da hidrocefalia.

Os cistos entram nas cavidades ventriculares pelo plexo coróide (Proaño et al., 2009) e então podem migrar para o espaço subaracnoideo. Durante a migração, uma vez que podem crescer e atingir grandes dimensões, os cistos podem obstruir os locais mais estreitos do sistema ventricular, especialmente o forame de Monro, o aqueduto de Sylvius, o quarto ventrículo (figura 5) e os forames de Luschka e Magendie (McCormick et al., 1982).

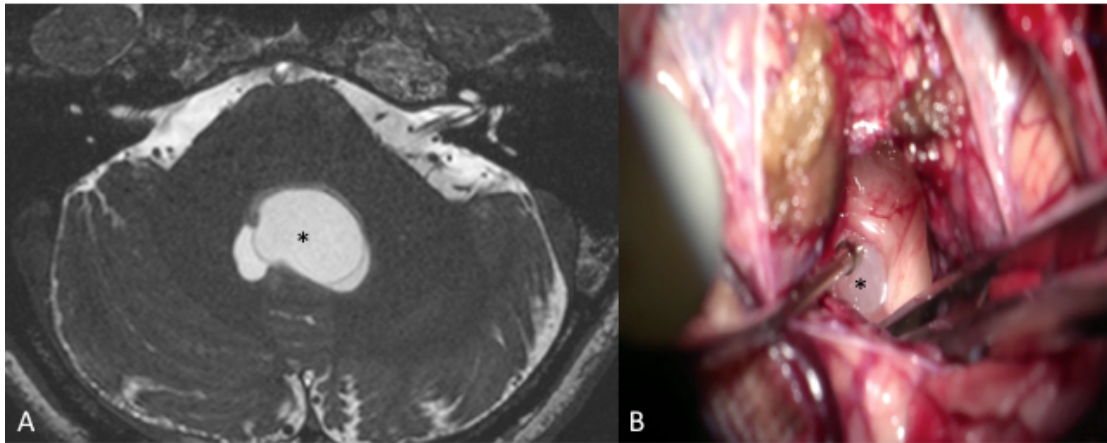


Figura 5. Cisto (\*) localizado no quarto ventrículo obstruindo a circulação de líquido. A: imagem axial de ressonância magnética em CISS. B: aspecto microcirúrgico intraoperatório. Acervo pessoal.

Por outro lado, a presença dos cistos no espaço subaracnoideo e em contato com a superfície ependimária dentro dos ventrículos desencadeia uma resposta inflamatória cuja evolução também causa obstrução da circulação do líquido (Sinha e Sharma, 2009; Matushita et al., 2011). Além disso, é possível que a reação inflamatória nas granulações aracnoideas limite a absorção do líquido para o sistema venoso (Carpio et al., 1994; Sotelo, 2011). Outro fator que pode contribuir com o desenvolvimento da hidrocefalia é o aumento da concentração de proteínas do líquido em razão das reações inflamatórias, tornando-o mais viscoso e diminuindo seu livre fluxo pelo espaço subaracnoideo (Amelot e Faillot, 2014).

Finalmente, é relevante observar que os dois mecanismos (obstrutivo e inflamatório) podem ocorrer simultaneamente em um mesmo paciente. É frequente observar pacientes com cistos obstruindo o sistema ventricular e com concomitante aracnoidite ou ependimite.

#### **1.4. Tratamento cirúrgico da hidrocefalia na neurocisticercose**

O tratamento da hidrocefalia é cirúrgico e pode ser realizado com derivações ventriculares – *shunts* – ou com procedimento endoscópico para terceiroventriculostomia. Para pacientes com hidrocefalia por neurocisticercose, o tratamento cirúrgico tem dificuldades adicionais.

Em 1994, Colli e colaboradores analisaram a evolução clínica de 180 pacientes com neurocisticercose submetidos a qualquer tratamento cirúrgico e observaram que as derivações ventriculares foram o procedimento cirúrgico mais frequente nessa casuística: 144 casos (80%) (Colli et al., 1994). Cuetter e colaboradores, em uma série de 11 pacientes com neurocisticercose intraventricular, observaram que 4 (36,4%) pacientes necessitaram de *shunt* em algum momento do seguimento clínico (Cuetter et al, 1997). Numa série de 46 pacientes com neurocisticercose subaracnoidea, Fleury e colaboradores observaram taxa de 32,6% de necessidade de *shunt* (15 casos) (Fleury et al., 2011). Séries de casos mais recentes continuam mostrando alta frequência de *shunts* para hidrocefalia na neurocisticercose. Considerando casos de neurocisticercose extraparenquimatosa, Bazan e colaboradores descreveram necessidade de DVP em 23 de 36 pacientes (63,9%) (Bazan et al., 2016), e Paiva e colaboradores, em 56,6% de seus pacientes (Paiva et al., 2017).

Se derivações ventriculares em geral já têm elevadas taxas de disfunção e infecção (Bayston et al., 1994), as derivações em pacientes com neurocisticercose têm taxas ainda mais elevadas (Kelley et al., 2002). E quanto maior o número de complicações associadas aos *shunts*, maior o risco de morbimortalidade em pacientes com hidrocefalia por neurocisticercose (DeGiorgio et al., 2002). Na década de 1980, reportaram-se taxas de mortalidade de 20 a 26%

em pacientes com hidrocefalia por neurocisticercose (Loyo et al., 1980; McCormick et al., 1982). Na casuística de Colli em 1994, a taxa de infecção associada a derivação ventricular foi de 36,1% e a necessidade de reoperação ocorreu em 54,2% dos pacientes (Colli et al., 1994). Cuetter e Andrews descreveram uma série de 18 pacientes com hidrocefalia associada a neurocisticercose, dos quais 10 necessitaram de *shunt*, com seis necessitando de pelo menos uma revisão dentro de 3 anos (Cuetter e Andrews, 2002). Kelley e colaboradores observaram taxa de disfunção de derivação ventricular em 57% dos pacientes (Kelley et al., 2002). Numa análise atualizada de sua casuística, Colli e colaboradores observaram taxa de 25,2% de infecção bacteriana dos *shunts* de pacientes com hidrocefalia por neurocisticercose, com uma mortalidade de 18,1% (Colli et al., 2002). Em nosso meio, Agapejev e colaboradores mostraram que, dos pacientes com derivações ventriculares por hidrocefalia na neurocisticercose, 53,6% necessitaram de pelo menos uma revisão, sendo que, em alguns casos, até sete revisões foram necessárias. Além disso, observaram forte correlação entre o número de revisões necessárias e a mortalidade (Agapejev et al., 2007). Mais recentemente, Bazan e colaboradores reportaram taxas de disfunção de derivações ventriculares de 65,2% e, de infecção, de 26,1% em pacientes com neurocisticercose (Bazan et al., 2016).

O uso de procedimentos endoscópicos em neurocirurgia foi um grande avanço para o manejo de hidrocefalia (Di Rocco et al., 2006). Casos de hidrocefalia obstrutiva podem ter uma alternativa de tratamento realizando-se a abertura do assoalho do terceiro ventrículo, o que o comunica diretamente com o espaço subaracnoideo (terceiroventriculostomia endoscópica – TVE). Para casos de hidrocefalia por neurocisticercose, a endoscopia também permite a excisão de

cistos com mais facilidade que através de craniotomia convencionais (Torres-Corzo et al., 2006; Rangel-Castilla et al., 2009; Zymberg, 2013). Além disso, os procedimentos neuroendoscópicos reduzem a necessidade de DVPs em muitos pacientes (Bergsneider et al., 1999; Husain et al., 2007; Suri et al., 2012), reduzindo a morbi-mortalidade associada aos *shunts*. Torres-Corzo e colaboradores, analisando a associação de procedimentos endoscópicos aos *shunts*, encontraram taxa de disfunção de 27,2% em pacientes tratados somente com *shunt* e de apenas 6,6% em pacientes tratados com a associação de *shunt* e endoscopia (Torres-Corzo et al., 2010). Além da redução da disfunção de *shunt*, a endoscopia também se mostrou benéfica numa análise de qualidade de vida de pacientes com hidrocefalia e neurocisticercose (Proaño et al., 2009).

Embora a endoscopia seja um grande avanço para o manejo da hidrocefalia na neurocisticercose, o procedimento não resolve todos os casos e tem limitações. Nos casos de hidrocefalia comunicante, a abertura do terceiro ventrículo para o espaço subaracnoideo não é tão efetiva, como ocorre em outros casos de hidrocefalia que combinam fatores obstrutivos e inflamatórios (Yadav et al., 2009). Nos casos de cistos em degeneração com intensa reação inflamatória adjacente, a remoção de cistos permanece arriscada também na endoscopia (Psarros et al., 2003; Goel et al., 2008; Ranjan et al., 2014). Finalmente, pode haver dificuldade em controlar sangramentos intraoperatórios nas técnicas endoscópicas.

### **1.5. Reprodução laboratorial da doença – modelos experimentais de neurocisticercose**

Considerando a heterogeneidade da apresentação clínica da doença, a variabilidade da interação parasita-hospedeiro, a influência do uso de corticoesteroides como confundidor da evolução da doença, a neurocisticercose é considerada uma doença enigmática (Agapejev, 2011). Por isso, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sobrevivência e evolução do parasita, da história natural da resposta inflamatória, e dos mecanismos de ação das drogas anti-helmínticas (Nash et al., 2006). Neste sentido, é importante reproduzir a doença em contextos controlados, como são os modelos experimentais.

Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos nos últimos anos (Arora et al., 2017). Na década de 1990, *Taenia crassiceps* (um cestodo análogo a *T. solium*) foi bastante utilizado em inoculações intraperitoneais de camundongos para avaliação de mecanismos envolvidos na permissividade do desenvolvimento da infestação. Com esse modelo, foi possível compreender a função de células T (Sciutto et al., 1995), de moléculas de histocompatibilidade (Fragoso et al., 1998) e de macrófagos (Rodríguez-Sosa et al., 2003) na proteção ou suscetibilidade ao parasita. Em síntese, demonstrou-se que respostas moduladas por reações imunológicas de padrão Th2 apontam para suscetibilidade à doença, enquanto o padrão Th1 está envolvido na proteção, ainda que transitória, à doença (Villa e Kuhn, 1996; Terrazas et al., 1998).

Seguiram-se, então, tentativas de inoculação intracraniana de cestodo em ratos e camundongos para replicar a neurocisticercose. Inicialmente, *T. crassiceps* não foi muito utilizado pois este parasita tem baixa capacidade de

invasão do parênquima cerebral de roedores, causando apenas deslocamento de estruturas adjacentes. Por essa razão, a inoculação de *Mesocestoides corti* foi mais utilizada (Cardona et al., 1999; Alvarez et al., 2010). Este modelo experimental reproduz mais apropriadamente a forma parenquimatosa da neurocisticercose e, com ele, foi possível observar o papel das células T gama-delta na promoção de uma resposta Th1 capaz de destruir o parasita (Cardona e Teale, 2002); as citocinas envolvidas no trânsito de leucócitos durante a infestação (Cardona et al., 2003); a expressão de receptores *toll-like* na imunidade inata contra o cisticerco (Mishra et al., 2006); a quebra das barreiras hemato-encefálica (BHE) e hemato-liquórica como fontes de infiltração leucocitária (Alvarez e Teale, 2006); a diferença de sítios vasculares no SNC durante a quebra de complexos juncionais, bem como as metaloproteinases de matriz produzidas para a infiltração de leucócitos (Alvarez e Teale, 2007a; Alvarez e Teale, 2008); a liberação de diferentes glicoconjugados tegumentares como estratégia do parasita para evadir da resposta imunológica do hospedeiro (Alvarez et al., 2008); e o papel de macrófagos ativados pelo gene STAT6 na defesa do hospedeiro contra o parasita (Mishra et al., 2011). Além disso, neste modelo, quando *M. corti* atinja o sistema ventricular, pôde-se estudar a função do epêndima como barreira, sítio de infiltração leucocitária e até mesmo como produtor de mediadores imunológicos (Alvarez e Teale, 2007b; Mishra e Teale, 2012).

Mais recentemente, novos modelos voltam a utilizar a inoculação de *T. crassiceps* para neurocisticercose experimental. Comparando-se camundongos BALB/c e C57BL/6, foi possível demonstrar diferenças na habilidade de destruir o parasita (Matos-Silva et al., 2012). Quando os parasitas atingem o sistema



ventricular, pôde-se observar uma resposta celular inicial caracterizada pela expressão de citocinas do padrão Th1/Th17 com posterior predominância de reações de padrão Th2 (Moura et al., 2016), que também está presente na análise de lesões parenquimatosas (Milhomem et al., 2018). De modo interessante, observa-se que a ausência genética de interleucina-4 (envolvida nas reações Th2) reduz a intensidade das reações inflamatórias, posto que diminui também a efetividade de destruição dos parasitas (Silva et al., 2017).

No entanto, os modelos murinos não replicam exatamente a doença, visto que há diferenças genéticas entre roedores e seres humanos, os parasitas análogos utilizados também têm diferenças em relação ao parasita causador da neurocisticercose humana e, finalmente, as inoculações intracranianas não são fidedignas ao ciclo biológico da *T. solium* e seu mecanismo de instalação no SNC de humanos. Há descrição de um modelo experimental com primatas que replica o ciclo biológico da neurocisticercose humana (Chowdhury et al., 2014), porém as dificuldades na manutenção de macacos limitam o uso deste modelo experimental de forma ampla.

Assim, três outros modelos experimentais foram criados. Verastegui e colaboradores (2015) conseguiram ativar oncosferas a partir de proglótides gravídicas de pacientes com teníase. A seguir, através de punção transcraniana, inocularam oncosferas no espaço subaracnoideo da convexidade cerebral e no próprio parênquima cerebral de ratos. Seus resultados mostraram que a taxa de sucesso da inoculação dependeu do número de oncosferas utilizadas e da idade dos ratos (Verastegui et al., 2015). Este modelo rompeu um paradigma anterior, de que *T. solium* não infectaria ratos. Fleury e colaboradores utilizaram método semelhante para obtenção de oncosferas e as introduziram no espaço

subaracnoideo e nos ventrículos cerebrais de suínos utilizando craniotomia. A taxa de eficiência de infecção variou de 3,6 a 5,4% (Fleury et al., 2015). Recentemente, resultados com maior taxa de sucesso de indução de neurocisticercose foram obtidos ao se injetar oncosferas ativadas através de punção carotídea em suínos (Alroy et al., 2018), o que tem o benefício adicional de replicar o modo de instalação de cistos no SNC a partir da circulação sistêmica. Por outro lado, esse modelo é de difícil execução, considerando a sofisticação de métodos para ativar oncosferas e a necessidade de dispor de pacientes com teníase.

Nenhum dos modelos anteriormente elencados, porém, teve como foco de investigação a hidrocefalia.

### ***1.6. Modelos experimentais de hidrocefalia***

O desenvolvimento de hidrocefalia por métodos experimentais começou no início do século XX. As primeiras tentativas foram de Burr e McCarthy, em 1900, que injetaram no ventrículo de felinos diversos irritantes como glicerina extraída de adrenal, urina e ácidos. Nenhum animal sobreviveu mais de dez dias e também não houve dilatação ventricular, mas os autores demonstraram inflamação do epêndima ventricular (Burr e McCarthy, 1900).

Entre 1907 e 1913, alguns autores obtiveram hidrocefalia como resultado secundário em modelos experimentais de meningite e papiledema (Flexner, 1907; Cushing e Bordley Jr, 1909). Em 1913 Thomas conseguiu provocar hidrocefalia em cães com injeção ventricular de aleuronato, um composto granular de albumina que irrita o epêndima. Este autor observou obstrução de

diversos pontos da circulação líquórica, como forame de Monro, aqueduto de Sylvius e na fossa posterior (Thomas, 1914).

Mas foram os trabalhos de Dandy, a partir de 1913, que tiraram o cunho idiopático da hidrocefalia para compreendê-la com uma doença de etiologia e mecanismos bem definidos. Dandy e Blackfan provocaram hidrocefalia em cães ao alojar pedaços de algodão no aqueduto de Sylvius e observar, então, dilatação ventricular supratentorial (Dandy e Blackfan, 1914). Além disso, ao retirar o plexo coroide de alguns animais, Dandy observou que estes não desenvolviam hidrocefalia, demonstrando, assim, que o líquido seria produzido no plexo coroide (Dandy, 1911).

Entre as décadas de 1930 e 1940, os trabalhos de Griffith Jr e colaboradores utilizaram uma suspensão de silicato de alumínio hidratado (mais conhecido como caulim) para injeção cisternal em ratos e conseguiram produzir hidrocefalia (Griffith Jr et al., 1935). O caulim causa uma resposta inflamatória meníngea que obstrui a circulação de líquido nas cisternas basais sem causar lesão no parênquima (Hochwald, 1985).

Diversos outros modelos de hidrocefalia utilizando agentes virais, déficits de vitaminas e agentes teratogênicos foram utilizado (Hochwald, 1985; Ingraham, 1947; Millen, 1956). No entanto, o modelo com caulim tem sido o mais empregado, pela facilidade de manipulação e acesso da substância e reprodutibilidade dos achados.

Demonstram-se hoje diversas alterações estruturais, funcionais, e comportamentais no SNC induzidas pela hidrocefalia experimental. Em ratos, a hidrocefalia determina redução da atividade exploratória, diminuição na força de prensão das patas anteriores, marcha instável com alargamento da distância

entre as patas posteriores, e diminuição de desempenho em testes de memória e localização. Em ratos recém-nascidos, observam-se atraso no ganho de peso e aumento do perímetro cefálico (Del Bigio et al., 2004; Olopade et al., 2012). Estruturalmente, tem-se demonstrado estiramento do epêndima, afilamento do corpo caloso, aumento do edema extracelular, redução na espessura do córtex e alterações da mielinização (Hochwald, 1985; Del Bigio, 1993; Lopes et al., 2003; Lopes et al., 2009).

### ***1.7. Fisiopatologia da hidrocefalia – perspectivas recentes***

O conceito clássico da fisiologia da circulação liquórica e da fisiopatologia da hidrocefalia permaneceu o mesmo durante muitos anos. No entanto, esse entendimento era insuficiente para explicar as alterações vistas na prática clínica (Brinker et al., 2014).

Diversos estudos nos últimos quinze anos têm mostrado a participação de outros mecanismos na produção, circulação e absorção do líquido. Sugere-se, por exemplo, a participação da barreira hemato-encefálica (BHE) como produtora de fluido intersticial cerebral e que este fluido participe da composição do líquido (Abbott, 2004). Com relação à absorção do líquido, há observações da participação do sistema linfático cervical que se comunicaria com o espaço subaracnoideo perineural de nervos cranianos e uma via pré-linfática junto a arteríolas do cérebro (Weller et al., 2010; Abbott et al., 2018).

De modo mais consistente, tem-se estudado o papel do espaço de Virchow-Robin como sítio de troca de fluidos entre o parênquima cerebral e o líquido. O espaço de Virchow-Robin é o espaço em que as arteríolas penetram no

córtex cerebral de modo a aproximar o espaço subaracnoideo da superfície pial e da glia limitante com consequente fenestração dos folhetos de pia-máter e aproximação da membrana basal de astrócitos com o endotélio capilar. Por essas características ultra-estruturais, considera-se haver fluxo bidirecional entre o espaço extracelular cerebral e o espaço subaracnoideo (Brinker et al., 2014). Este sítio de troca de água e metabólitos constitui o chamado sistema glinfático, cuja disfunção estaria envolvida também no desenvolvimento de doenças degenerativas (Jessen et al., 2015; Plog e Nedergaard, 2018).

Outros autores sugerem a participação de forças hidrostáticas e osmóticas que atuam em toda a superfície cerebral em contato com espaços liquóricos, determinando não mais uma circulação unidirecional de líquido, mas, sim um movimento de água no SNC, cujo desbalanço seria a causa de hidrocefalia (Oreskovic e Klarica, 2010; Oreskovic e Klarica, 2014; Oreskovic et al., 2017). Porém essa hipótese, que questiona os conceitos clássicos da fisiologia liquórica, é bastante contestada (Hladky e Barrand, 2014; Spector et al., 2015).

Estudos recentes têm chamado a atenção para o papel das aquaporinas na fisiologia do líquido e na fisiopatologia da hidrocefalia. As aquaporinas são proteínas de membrana que funcionam como canal de água nas células. No SNC, as mais frequentes são as aquaporinas-1 (AQP-1) e 4 (AQP-4).

A AQP-1 é mais encontrada no plexo coroide, com função relacionada à produção de líquido. Animais com deficiência de AQP-1 (AQP-1 ko – nocaute) têm produção de líquido 20% menor que animais selvagens. Na hidrocefalia, a AQP-1 fica interiorizada na célula, sugerindo mecanismo compensatório para reduzir a produção de líquido (Owler et al, 2010).

A AQP-4 é a que tem recebido maior atenção nas investigações de

circulação de líquido. É encontrada nos pés vasculares de astrócitos, na glia limitante e na membrana basolateral de células endoteliais (Skjolding et al., 2013). Sua expressão está alterada em diversas afecções do SNC como tumores, lesões traumáticas, isquemias, abscessos e, notadamente, na hidrocefalia. Na hidrocefalia, a AQP-4 parece ter uma função compensatória como via alternativa para absorção do líquido na substância branca periventricular (Owler et al., 2010). Animais AQP-4 ko têm progressão mais acelerada da hidrocefalia induzida por caulim (Bloch et al., 2006), além de maior acúmulo de água no interstício do SNC, deterioração neurológica e aumento da pressão intracraniana (Skjolding et al., 2010).

Em condições fisiológicas, a AQP-4 está localizada nos pés vasculares de astrócitos. Sob injúria, este padrão de expressão de AQP-4 se relaciona à formação do edema (visto em imagem de ressonância magnética – RM, como aumento do coeficiente de difusão aparente). Na fase de resolução do edema, a AQP-4 é expressa em toda a membrana do astrócitos, o que corresponde a uma tentativa de aumentar o *clearance* de água livre no tecido cerebral (Tourdias et al., 2011).

## **2. Justificativa: um modelo experimental que combine neurocisticercose e hidrocefalia**

Considerando as particularidades da hidrocefalia na neurocisticercose e considerando a importância de modelos biológicos experimentais que reproduzam a doença a fim de abrir novas perspectivas de compreensão fisiopatológica e possibilidades terapêuticas, desenvolvemos previamente um modelo experimental de hidrocefalia induzida por neurocisticercose. Neste modelo, foi observado que a hidrocefalia ocorre de modo progressivo, diferentemente do clássico modelo experimental com caulim (Hamamoto Filho et al., 2016). Além disso, esse modelo combina fatores obstrutivos mecânicos e inflamatórios, assemelhando-se, então, aos mecanismos responsáveis pela hidrocefalia na neurocisticercose humana (Hamamoto Filho et al., 2017).

O desenvolvimento da hidrocefalia induzida por caulim é rápido e compromete significativamente a condição dos animais, dificultando a realização de avaliações de longo prazo. A taxa de indução de hidrocefalia por caulim é variável e a mortalidade dos animais pode ser alta dependendo da concentração utilizada de caulim (Shaolin et al., 2015). Assim, esse modelo não reproduz com exatidão a hidrocefalia de padrão crônico que pode ocorrer em alguns casos de neurocisticercose em humanos. Em nosso modelo de hidrocefalia induzida por neurocisticercose, empiricamente, não havíamos observado adoecimento dos animais, perda de peso ou comprometimento neurológico importante. Assim, levantamos a **hipótese** de que a hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental é de evolução lenta e progressiva, permitindo ao animal a adoção de mecanismos compensatórios que retardam o comprometimento neurológico.

### **3. Objetivo**

Caracterizar a hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental em ratos com relação ao comportamento dos animais, ao aspecto radiológico das lesões, às alterações morfológicas do encéfalo e à imunorreatividade de GFAP e aquaporina 4.



#### **4. Materiais e Métodos**

Os animais foram manuseados de acordo com protocolos éticos e com a legislação vigente após análise e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 1148/2015). Eventuais perdas de animais que prejudicassem o tamanho amostral seriam repostas com novos animais.

Foram utilizados 52 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de 5 a 7 semanas de idade, pesando entre 100-200g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram mantidos em caixas (três animais por caixa, com 258cm<sup>2</sup> por animal), alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 21° C) e de umidade.

##### **4.1. Cálculo do tamanho amostral**

De acordo com estudo piloto, com 5 animais em cada grupo é possível determinar diferenças estatísticas entre os grupos do ponto de vista de volume ventricular (Hamamoto Filho et al., 2016). Assim, assumindo uma mortalidade de 30% após os procedimentos de inoculação, alocaram-se 8 animais em cada subgrupo de análise. O tamanho amostral foi estimado pressupondo amostragem aleatória simples, erros tipo I e II iguais a 0,05 e 0,20, respectivamente, volume ventricular normalmente distribuído com média em torno de 60 mm<sup>3</sup> ± 20 e ausência de potenciais fatores confundidores, igualmente distribuídos pela randomização. Eventuais perdas de animais após os procedimentos experimentais de inoculação foram reparadas com a inclusão de novos animais se houvesse redução importante do número de animais necessários em cada grupo experimental.

#### **4.2. Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em 4 grupos. No primeiro grupo, 16 animais foram submetidos à inoculação cisternal de 50 cistos de *T. crassiceps* (grupo cistos), num volume total de 0,02ml. No segundo, 15 animais foram submetidos à inoculação cisternal de 0,02ml de suspensão antigênica obtida a partir do processamento de cistos de *T. crassiceps* (grupo antígenos) No terceiro grupo, 8 animais foram submetidos à inoculação cisternal de 0,02ml de suspensão de caulim a 25% (grupo caulim). Neste grupo, houve morte de 6 animais após a inoculação, acrescentando-se 5 novos animais para reposição, No quarto grupo, 8 animais foram submetidos a injeção de 0,02ml de salina 0,9%. (grupo controle).

Ao final de 1 mês de observação, todos os animais foram submetidos a teste comportamental e a ressonância magnética de encéfalo. A partir de amostragem sistemática (animais intercalados), metade dos animais dos grupos cistos, antígenos e controle e todos os animais do grupo caulim foram eutanasiados para retirada do encéfalo para estudos histológico e imunohistoquímico. Por questões éticas, animais do grupo caulim não foram mantidos vivos por mais de um mês, pois a hidrocefalia induzida por caulim lhes determinaria importante adoecimento e sofrimento após esse período.

Os animais restantes foram mantidos em observação por mais 5 meses, completando 6 meses de observação. Ao final desse período, foram submetidos a novo teste comportamental e a ressonância magnética, após a qual foram eutanasiados para retirada do encéfalo. Para eutanásia dos animais, foi utilizada *overdose* de tiopental (100mg/kg) via intraperitoneal. Os animais foram pesados antes da inoculação e antes de cada exame de ressonância magnética. A figura 6 apresenta um esquema do delineamento experimental.

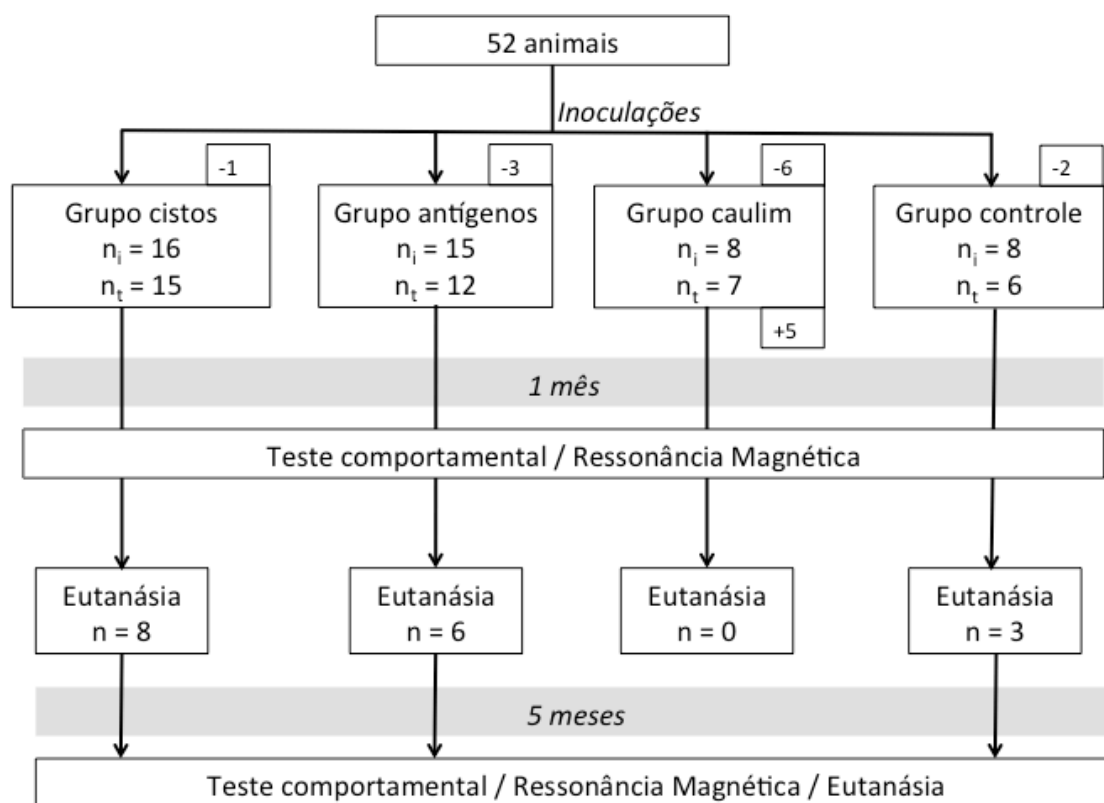


Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental.

#### 4.3. Parasitas e inoculações

Cistos de *T. crassiceps* mantidos na cavidade peritoneal de camundongos (*Mus musculus*) (Willms e Zurabian, 2010), foram retirados de forma asséptica e separados em placa de Petri. Cistos viáveis foram separados para inoculação direta nos animais do grupo cistos (50 cistos por rato, volume total = 0,02ml), considerando o tamanho, a integridade e a motilidade (figura 7).

Para preparo de solução antigênica, os cistos restantes foram mantidos em solução fisiológica com inibidor de protease (SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA Free – Sigma-Aldrich®) a  $-2^{\circ}$  C. Posteriormente, foram submetidos a sonicação (Sonics & Materials) com 2 ciclos de 1 minuto a  $10^{\circ}$  C e

amplitude de 60%. O material resultante foi centrifugado a 0° C e 180rpm por 1 minuto. Foi utilizado o sobrenadante, cuja concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, atingindo 2,86 mg/ml. Em cada animal do grupo 2, foi injetado 0,02ml do sobrenadante.

O grupo caulim recebeu 0,02ml de silicato de alumínio (caulim) a 25% por inoculação cisternal. O grupo controle recebeu 0,02ml de salina 0,9% por inoculação cisternal.

Para os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (100mg/ml) e xilazina (20mg/ml) numa dose de 0,1ml/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. A sutura da pele foi feita em seguida com fio mononylon 4.0.

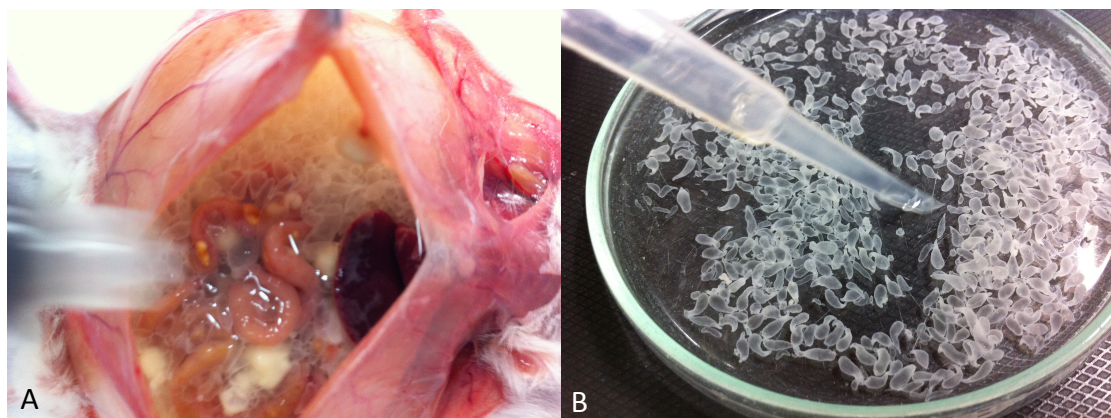


Figura 7. Retirada de cistos de *T. crassiceps* retirados da cavidade peritoneal de camundongo (A) e seleção em placa de Petri de cistos viáveis (B).

#### **4.4. Estudo comportamental**

O estudo do comportamento dos animais foi feito com teste de campo aberto, como realizado por Olopade et al, 2012. Para tal, foi utilizada uma caixa de 72x72cm com linhas no assoalho dividindo-a em quadrados de 18x18cm. Cada rato foi colocado na caixa por um período de 5 minutos durante os quais foi filmado utilizando câmera digital GoPro Hero 3+ (GoPro Inc, EUA) (figura 8). As gravações foram analisadas por observador independente que avaliou os seguintes parâmetros: movimentos horizontais (medidos pelo número de linhas atravessadas), movimentos verticais (medidos pelo número de vezes com que o rato se apoia apenas nas patas traseiras), tempo de centro (tempo que o animal passa no quadrado central) e número de evacuações.



Figura 8. Teste de campo aberto. Cada animal foi observado durante 5 minutos, considerando as linhas cruzadas, apoio na pata traseira, tempo de centro e número de evacuações

#### **4.5. Avaliação radiológica**

Os exames de ressonância magnética (RM) foram realizados nas dependências do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu. Os exames foram realizados em aparelho Esaote – modelo vet MR grande, de 0,25 T. Foram adquiridas imagens de 0,6mm de espessura de corte na sequência eco gradiente 3D Hyce (tempo eco 5ms e tempo repetição 10ms).

Para a realização dos exames de RM, os animais foram anestesiados com mistura de cetamina a 100mg/ml e xilazina a 20mg/ml na dose de 0,5ml/kg de peso por via intraperitoneal.

Os exames de RM foram analisados identificando a distribuição de cistos nos ventrículos e no espaço subaracnoideo. A quantificação do grau de hidrocefalia foi realizada através de estudo volumétrico utilizando o *software* livre ITK-SNAP (versão 3.0.0) (Yushkevich et al., 2006) (figura 9). Foram considerados hidrocefálicos os animais cujo volume ventricular fosse superior a 5mm<sup>3</sup> (Harris et al., 1992).

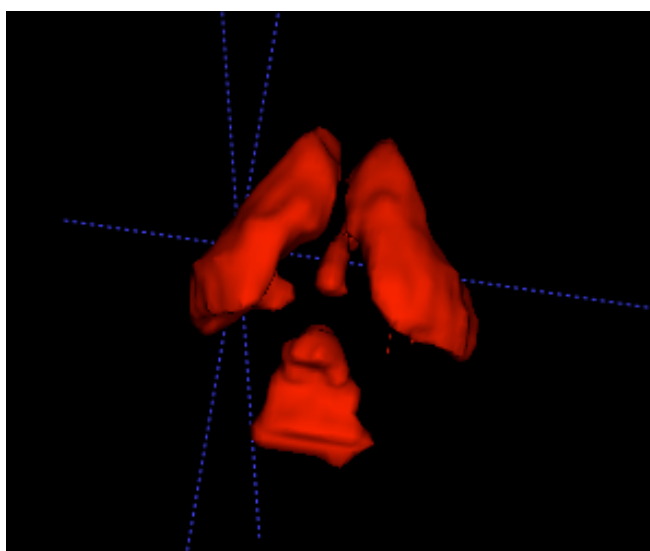


Figura 9. Representação tridimensional do volume ventricular gerada pelo software ITK-SNAP.

#### **4.6. Análise morfológica**

Após eutanásia dos animais foi realizada perfusão cardíaca com soro fisiológico seguido de formaldeído a 10% para fixação do encéfalo. Em seguida, o encéfalo foi retirado e seccionado transversalmente na topografia do quiasma óptico utilizando-se matriz de encéfalo (Insight, Brasil) para cortes comparáveis. Os fragmentos foram, então, colocados em cassetes e mantidos em formaldeído por 12 horas em temperatura ambiente. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em banhos de álcool, clarificadas em xilol e então parafinizadas.

Para análise da morfologia geral do encéfalo, os blocos foram seccionados em micrótomo com espessura de 5 $\mu$ m e os cortes, corados com hematoxilina e eosina.

Para estudo imunoistoquímico (IHQ), foram utilizados marcadores de GFAP (um marcador de astrogliose reativa a injúrias no SNC) e de aquaporina-4. Para IHQ, os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo com espessura de 3 $\mu$ m. Os cortes foram, então, desparafinizados em banhos de xileno (5 minutos cada) e gradativamente reidratados em banhos de álcool de concentrações decrescentes (3 minutos cada) até a água. Para recuperação antigênica, as lâminas foram aquecidas em panela de pressão elétrica, a 98 – 99°C, com solução tampão de Citrato pH 6,0, por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas as colorações imunoistoquímicas. As lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 0,3%, por 15 minutos, em temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos. A seguir, foram lavadas em solução tampão Tris com Tween 20, pH 7,4 – 7,6 (TBST). Os anticorpos primários anti-aquaporina 4 (1:50) e anti-GFAP (1:600) (Biorbyt, Inglaterra) foram então incubados nas lâminas por 1 hora, em temperatura ambiente, dentro de câmara

úmida. Após lavagem em solução tampão TBST, foi aplicado o anticorpo secundário polímero conjugado com a enzima peroxidase *horseradish* (HRP) sobre as lâminas e estas foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente, dentro de câmara úmida. Depois de nova lavagem em TBST, a revelação da reação foi feita através da aplicação do substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), com incubação durante 5 minutos em temperatura ambiente, gerando precipitado de cor marrom no sítio de expressão das proteínas-alvo. Após incubação com DAB, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, desidratadas com passagem em bateria de álcool e xileno e montadas com lamínulas de vidro mais meio de montagem permanente.

A avaliação morfológica foi realizada por patologista experiente considerando os seguintes parâmetros: gliose e inflamação periventricular, edema e inflamação do plexo coróide, inflamação periventricular, identificação de parasitas nas cavidades ventriculares e espaço subaracnoideo, e positividade de reatividade das proteínas GFAP e AQP-4. Para análise imuno-histoquímica, a análise dos grupos subdividiu os animais dos grupos cistos e antígenos em subgrupos 1 mês e 6 meses, de acordo com a realização da eutanásia.

Para análise morfométrica, foi utilizado o software Image Pro Plus 8. Esta análise é baseada na contagem por 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. Durante o processo de captura das imagens, foi realizada apenas a identificação dos grupos para completo cegamento dos casos individuais.



#### **4.7. Análise estatística**

Para comparação entre múltiplos grupos foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação de dois grupos independentes e o teste de Wilcoxon para comparações pareadas. Para variáveis com distribuição normal, foram realizados os testes t de *student* e ANOVA para análise de variância. Para estudar correlação de variáveis foi utilizado o teste de Spearman. Diferenças foram consideradas significantes com  $p < 0,05$ . Para as análises, foram utilizados os *softwares* SPSS (v. 21.0), R (v. 2.11.0) e GraphPad (v. 5.0).

## **5. Resultados**

Dos 52 animais utilizados, houve óbito precoce após as inoculações em um animal do grupo cistos, em 3 do grupo antígenos, em 6 do grupo caulim e em 2 do grupo controle. Assim, a mortalidade pós-inoculação foi de 23%. Com isso, 40 animais foram observados ao longo do estudo. Destes 40 animais, houve perda de outros 2 animais: um do grupo controle antes da realização da ressonância magnética e um do grupo antígenos logo após a ressonância magnética. Assim, 38 animais mantiveram o tempo de observação planejado: 15 do grupo cistos, 11 do grupo antígenos, 7 do grupo caulim e 5 do grupo controle.

Após um mês de observação, foi realizada eutanásia de todos os animais do grupo caulim, de 7 animais do grupo cistos, 6 do grupo antígenos, e 3 do grupo controle. Assim, permaneceram em observação até os seis meses 8 animais do grupo cistos, 5 do grupo antígenos e 2 do grupo controle. Neste período, um animal do grupo cistos foi a óbito, restando 37 animais que completaram o tempo de observação planejado. Finalmente, um animal do grupo cistos e um do grupo antígenos foram a óbito após a segunda ressonância magnética e não realizaram teste comportamental.

### ***5.1. Variação do peso***

Entre os 37 animais que completaram o tempo de observação planejado, não observamos diferença no peso inicial dos animais. Após um mês de observação, o peso médio dos animais, segundo os grupos, era de 305,6g no grupo cistos, 308,2g no grupo antígenos, 239,9 no grupo caulim, e 307,7 no grupo controle, com o grupo caulim apresentando peso significativamente menor que os outros grupos ( $p = 0,039$ ).

Ao final do sexto mês de observação, o grupo cistos apresentava peso médio de 434,7g, o grupo antígenos, de 567,0g, e o grupo controle, de 530,0g. Nesta medida, o peso médio do grupo cistos foi significativamente menor em comparação com os outros grupos ( $p = 0,029$ ). O gráfico 1 apresenta a evolução do peso dos animais de acordo com os grupos.

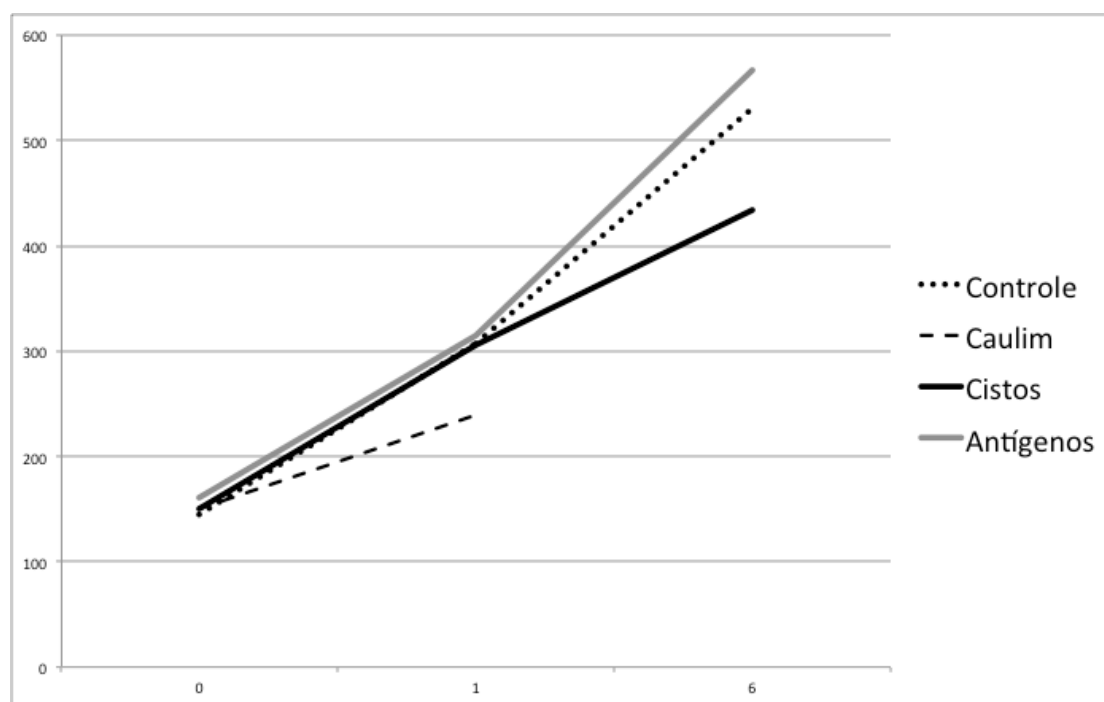


Gráfico 1: variação do peso dos animais ao longo do período de observação, de acordo com os grupos. No momento inicial, o peso dos animais era semelhante entre os grupos. Ao final do primeiro mês, o grupo caulim apresentava peso médio significativamente menor que os demais grupos ( $p = 0,039$ ). E ao final do sexto mês, o grupo cistos apresentava peso médio significativamente menor que o grupo controle e antígenos ( $p = 0,029$ ).

## 5.2. Alterações comportamentais

Ao final do primeiro mês de observação, a comparação dos parâmetros de movimentos verticais, tempo de centro e número de evacuações não mostrou diferenças entre os grupos. Apenas no parâmetro de movimentos horizontais (número de linhas cruzadas), o grupo caulim apresentou desempenho inferior (16,14 linhas cruzadas por animal, em média) em relação aos outros grupos cistos (38,93) e antígenos (49,00),  $p = 0,023$ . A tabela 1 resume os dados do teste comportamental ao final do primeiro mês.

Ao final dos seis meses de observação, os animais do grupo cistos permaneceram por mais tempo, em média, no centro da caixa (127,4s) do que os animais dos grupos antígenos (12,25s) e que os animais do grupo controle (8,5s) (tabela 2). No entanto, esta diferença não teve significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1: Média dos parâmetros do teste comportamental ao final do primeiro mês de observação, por grupos.

Grupo	Movimentos verticais (n)	Movimentos horizontais (n)	Tempo de centro (s)	Evacuações (n)
<b>Cistos (n = 15)</b>	11,93	38,93*	4,64	2,86
<b>Antígenos (n = 11)</b>	19,09	49,00*	6,55	1,91
<b>Caulim (n = 7)</b>	8,86	16,14*	6,57	1,14
<b>Controle (n = 5)</b>	9,00	24,40	2,20	1,80

\*  $p = 0,023$ , teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, comparando-se cistos vs caulim e antígenos vs caulim

Tabela 2: Média dos parâmetros do teste comportamental ao final de seis meses de observação, por grupos.

Grupo	Movimentos verticais (n)	Movimentos horizontais (n)	Tempo de centro (s)	Evacuações (n)
<b>Cistos (n = 5)</b>	14,80	34,20	127,40*	3,20
<b>Antígenos (n = 4)</b>	15,25	34,25	17,25*	4,50
<b>Controle (n = 2)</b>	19,50	39,50	8,50	4,50

\*  $p > 0,05$ , teste de Mann-Whitney, comparando-se cistos vs controle e antígenos vs controle.

Observando-se as tabelas 1 e 2 é possível verificar que o tempo de centro aumentou consideravelmente para os animais dos grupos cistos e antígenos, de 4,64 para 127,40 segundos e de 6,55 para 17,25, respectivamente. O teste de Wilcoxon comparando estes dados mostrou valor  $W$  de 1, sendo que o valor crítico seria de 5, portanto, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e, com seis meses de observação, os animais com inoculação de cistos e antígenos, de modo agrupado, passaram mais tempo no centro da caixa do que na avaliação de um mês pós-inoculação. Porém o pequeno tamanho da amostra destes grupos aos seis meses não permite inferência estatística para cada grupo isoladamente.

### ***5.3. Alterações radiológicas***

Após o primeiro mês de observação, os volumes ventriculares médios foram de  $1,12\text{mm}^3$  no grupo controle;  $59,01\text{mm}^3$  no grupo cistos;  $2,18\text{mm}^3$  no grupo antígenos; e  $112,83\text{mm}^3$  no grupo caulim (figura 10). Utilizando teste de comparações múltiplas, pode-se afirmar que os grupos cistos e caulim não tiveram diferenças significativas entre si, como também não os grupos antígenos e controle. Todas as demais comparações mostraram diferenças estatisticamente significativas. Portanto, os grupos cistos e caulim tiveram volume ventricular médio maior que os grupos antígenos e controle ( $p = 0.0003$ ). Com relação ao desenvolvimento de hidrocefalia, considerando o valor de corte de  $5\text{mm}^3$ , no primeiro mês pós inoculação, 9 animais desenvolveram hidrocefalia no grupo cistos (9/15), 4 no grupo caulim (4/7), e um no grupo antígenos (1/11). No grupo controle, nenhum animal teve hidrocefalia (tabela 3). Após o sexto mês de observação, 4 animais do grupo cistos tiveram hidrocefalia (4/6), um no grupo

antígenos (1/5) e nenhum do grupo controle. A tabela 3 mostra os dados de volumetria ventricular. Os volumes ventriculares médios foram de 568,85mm<sup>3</sup> no grupo cistos; 3,57mm<sup>3</sup> no grupo antígenos; e 1,15mm<sup>3</sup> no grupo controle (figura 11). As outras comparações entre os grupos não mostraram diferenças em razão da grande variabilidade de volumes ventriculares do grupo cistos. O volume ventricular do grupo cistos foi significativamente maior aos 6 meses do que no primeiro mês pós-inoculação (tabela 3).

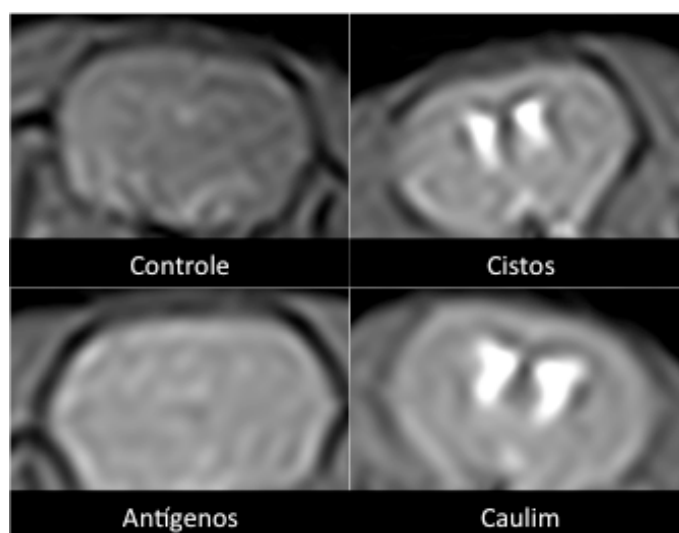


Figura 10. Ressonância magnética ilustrativa do padrão de dilatação ventricular dos grupos experimentais no primeiro mês após as inoculações. Os grupos controle e antígenos não apresentaram ventrículos dilatados, diferentemente dos grupos cistos e caulim.

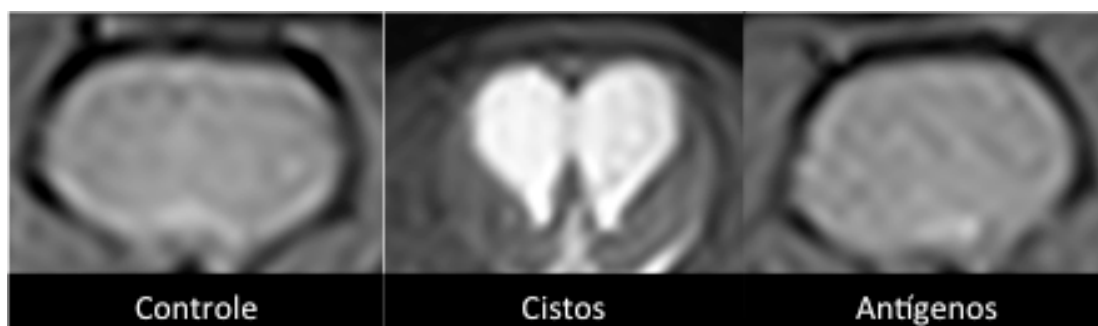


Figura 11. Ressonância magnética ilustrativa do padrão de dilatação ventricular dos animais dos grupos experimentais mantidos vivos até o sexto mês após as inoculações. Os grupos controle e antígenos não apresentaram ventrículos dilatados, diferentemente dos grupos cistos.

Tabela 3: Volume ventricular médio dos grupos experimentais no primeiro e no sexto mês pós-inoculação.

Grupo	Volume ventricular – 1 mês Média ± desvio padrão (mm <sup>3</sup> )*	Volume ventricular – 6 meses Média ± desvio padrão (mm <sup>3</sup> )**
Cistos	59,01 ± 89,52 <sup>&amp;</sup>	568,85 ± 515,93 <sup>&amp;</sup>
Antígenos	2,18 ± 1,24	3,57 ± 1,9
Caulim	112,83 ± 158,14	-
Controle	1,12 ± 1,13	1,15 ± 0,26

\* No primeiro mês, o volume do grupo cistos foi superior ao do grupo antígenos e controle, como também o foi o grupo caulim. Não houve diferenças estatísticas entre os volumes dos grupos cistos vs caulim, nem entre os volumes dos grupos antígenos vs controle.

\*\* No sexto mês, apesar da grande diferença de volume ventricular médio, o cálculo estatístico não mostrou significância em razão da grande variabilidade dos volumes do grupo cistos.

<sup>&</sup>p = 0,028

No grupo inoculado com cistos (n = 15), em 10 animais foi possível detectar cistos nas cisternas da base do crânio, na cisterna magna, nos ventrículos ou no espaço subaracnoideo da coluna cervical proximal ou da convexidade cerebral (figura 12). Dos seis animais que não desenvolveram hidrocefalia no grupo cistos, apenas um apresentava cistos na imagem de ressonância magnética – todos os outros cinco não apresentaram cistos detectáveis na imagem, seja no primeiro mês, seja no sexto mês. Ou seja, dos 10 animais com cistos detectáveis, 9 tinham hidrocefalia; e dos 6 animais que não tinham hidrocefalia, apenas um tinha cistos detectáveis.

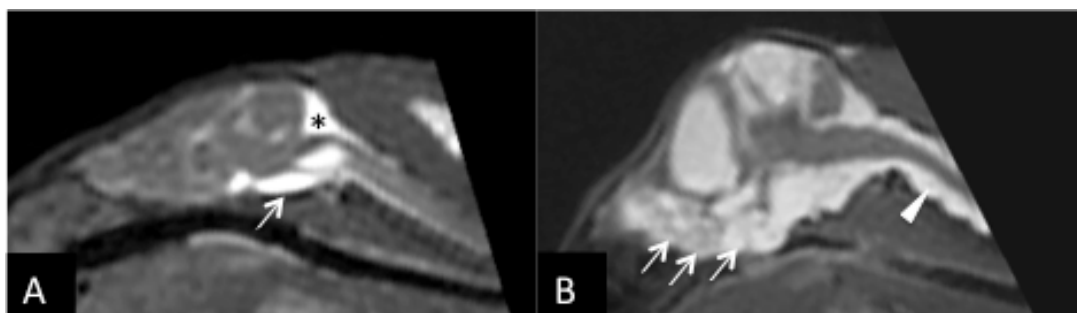


Figura 12. Ressonância magnética de animais do grupo cistos mostrando o padrão de distribuição de cistos nos espaços liquóricos. A: RM 1 mês após a inoculação, B: RM 6 meses após a inoculação. Seta: cistos nas cisternas da base. Ponta da seta: cistos no espaço subaracnoideo da coluna cervical. \* cistos na cisterna magna.

Considerando a ressonância magnética do primeiro mês, cistos nas cisternas da base foram encontrados em 6 animais; cistos na cisterna magna, em 9 animais; e cistos no espaço subaracnoideo da coluna cervical, em 3 animais. No primeiro mês não houve detecção de cistos ventriculares em nenhum animal, como também não no espaço subaracnoideo da convexidade. Já no sexto mês, considerando 6 animais remanescentes, dois deles não tinham hidrocefalia. Todos os outros 4 animais (hidrocefálicos) apresentavam cistos nas cisternas da base, na cisterna magna e no espaço subaracnoideo da convexidade. Três apresentavam cistos ventriculares e um, no espaço subaracnoideo da coluna cervical. As tabelas 4 e 5 apresentam os dados detalhados da distribuição de cistos e volume ventricular de cada um dos animais do grupo cistos.

Tabela 4: Distribuição de cistos intracranianos entre os animais inoculados com cistos de *Taenia crassiceps*, após um mês de inoculação, apresentados em ordem crescente de acordo com o volume ventricular.

<b>Animal</b>	<b>Volume ventricular</b>	<b>Hidrocefalia</b>	<b>Cisternas da base</b>	<b>Cisterna magna</b>	<b>Coluna cervical</b>	<b>Ventrículos</b>	<b>Convexidade</b>
15	1,04	Não	-	-	-	-	-
12	1,19	Não	-	-	-	-	-
04	1,34	Não	-	-	-	-	-
01	2,45	Não	-	-	-	-	-
07	2,97	Não	-	-	-	-	-
13	4,60	Não	<b>Sim</b>	-	-	-	-
14	10,16	<b>Sim</b>	-	<b>Sim</b>	-	-	-
09	14,02	<b>Sim</b>	-	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-
10	21,28	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-	-	-
03	43,46	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-	-
08	72,60	<b>Sim</b>	-	<b>Sim</b>	-	-	-
11	74,97	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-	-
05	103,30	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-
02	207,60	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-	-
06	324,20	<b>Sim</b>	-	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-



Tabela 5: Distribuição de cistos intracranianos entre os animais inoculados com cistos de *Taenia crassiceps*, após seis meses de inoculação, apresentados em ordem crescente de acordo com o volume ventricular.

Animal	Volume ventricular	Hidrocefalia	Cisternas da base	Cisterna magna	Coluna cervical	Ventrículos	Convexidade
12	1,56	Não	-	-	-	-	-
04	2,67	Não	-	-	-	-	-
14	491,20	Sim	Sim	Sim	-	Sim	Sim
02	513,40	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
08	934,30	Sim	Sim	Sim	-	-	Sim
10	1470,00	Sim	Sim	Sim	-	Sim	Sim

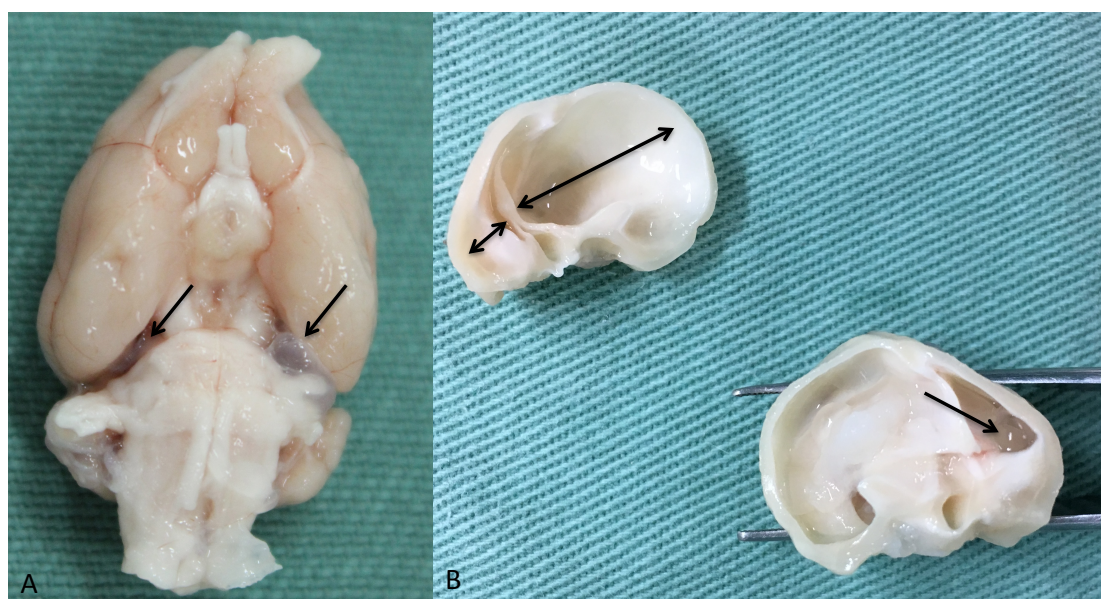


Figura 13. Aspecto macroscópico do encéfalo de animais inoculados com cistos. Em (A) é possível observar cistos nas cisternas basais (setas) e, em (B), após corte transversal, é possível observar assimetria ventricular (setas duplas) bem como cisto intraventricular (seta)

#### **5.4. Alterações morfológicas**

Após a retirada dos encéfalos, foram observados macroscopicamente cistos na cisterna magna e justapostos ao tronco encefálico dos animais do grupo cistos. Após os cortes na altura do quiasma óptico, foi possível também encontrar cistos intraventriculares, com dilatações simétricas e assimétricas dos ventrículos laterais (figura13).

Os grupos experimentais cistos, antígenos e caulim mostraram alterações morfológicas na região periventricular, periependimária e no plexo coroide. Na região periventricular, foram observadas astrogliose reativa e células inflamatórias linfocíticas. Na região periependimária, observamos também infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos. E no plexo coroide, observamos aumento de sua área às custas de edema, como também de infiltração de linfócitos. A figura 14 mostra o padrão de alterações histológicas.

Comparando-se as alterações histológicas por grupos, a astrogliose reativa ocorreu de modo semelhante nos grupos cistos, antígenos e caulim em comparação com o grupo controle (gráfico 2). No entanto, o infiltrado inflamatório periventricular foi ainda mais intenso no grupo cistos do que nos demais grupos, como mostra o gráfico 3.

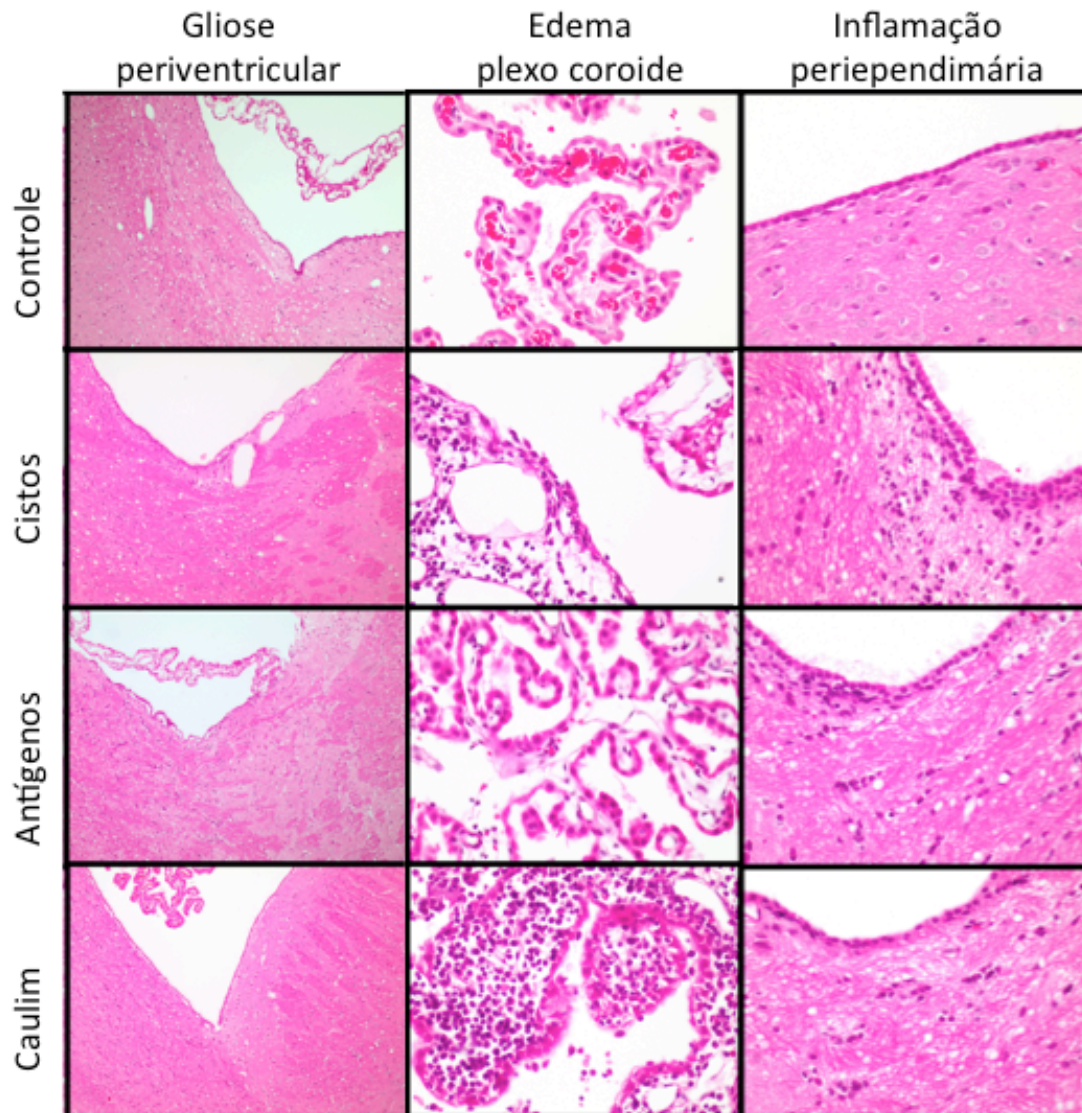


Figura 14. Painel de alterações histológicas nos grupos experimentais mostra astrogliose reativa nos grupos cistos, antígenos e caulim. Edema de plexo coroide e infiltrado inflamatório linfocítico são observados principalmente nos grupos cistos e caulim. Já infiltrado inflamatório periepêndimário ocorre de forma mais nítida nos grupos cistos e antígenos.

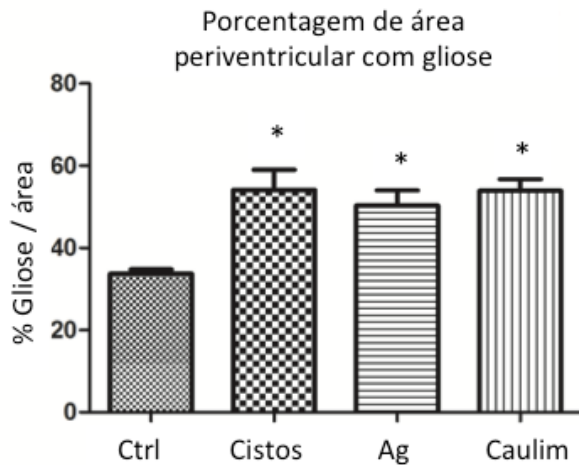


Gráfico 2. Porcentagem de área periventricular com gliose, de acordo com grupos. Todos os grupos experimentais tiveram maior porcentagem de gliose periventricular quando comparados ao grupo controle. \*  $p < 0,05$  para controle vs demais grupos (Ctrl: controle; Ag: antígenos).

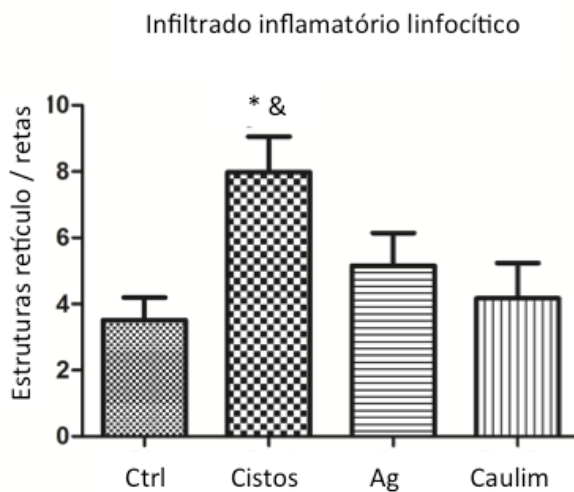


Gráfico 3. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico periventricular, segundo a contagem de retículos de Weibel. Os animais dos grupos cistos e antígenos apresentaram maior infiltrado inflamatório que os grupos controle e caulim, com diferença estatística para as alterações do grupo cistos em comparação aos grupos controle e caulim. \*  $p < 0,05$  para cistos vs controle; &  $p < 0,05$  para cistos vs caulim.

Com relação às alterações no plexo coroide, observamos maior intensidade de edema e de infiltrado inflamatório linfocítico nos grupos cistos e caulim em comparação com os grupos controle e antígenos, como mostram os gráficos 4 e 5.

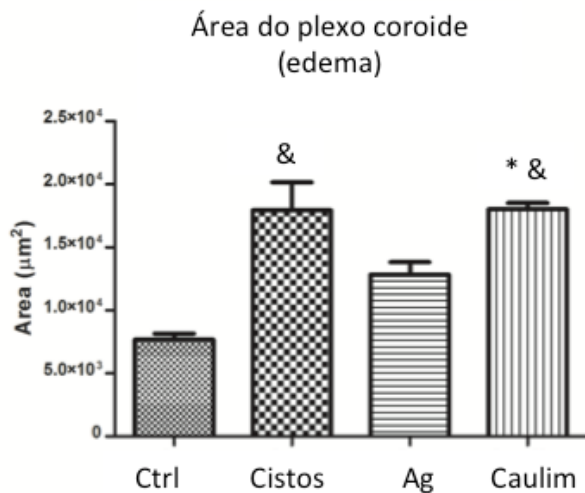


Gráfico 4. Área de edema do plexo coroide mensurada pela área do plexo coroide. Os grupos cistos e caulim apresentaram mais edema do plexo coroide. \*  $p < 0,05$  para antígenos vs caulim. &  $p < 0,05$  para controle vs caulim e controle vs cistos.

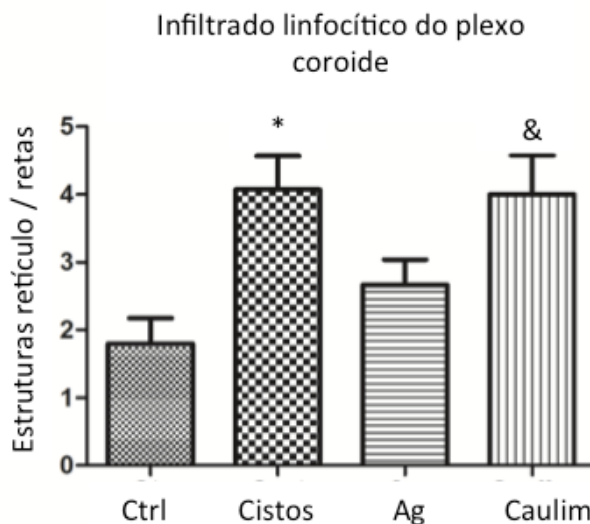


Gráfico 5. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico no plexo coroide, segundo a contagem de retículos de Weibel. Os animais dos grupos cistos e caulim apresentaram maior infiltrado inflamatório que os grupos controle e antígenos, com diferença estatística em relação ao grupo controle. \*  $p < 0,05$  para cistos vs controle; &  $p < 0,05$  para caulim vs controle.

E comparando-se a intensidade do infiltrado inflamatório linfocítico na região subependimária, observamos sua ocorrência de modo semelhante apenas nos grupos cistos e antígenos, como mostra o gráfico 6.

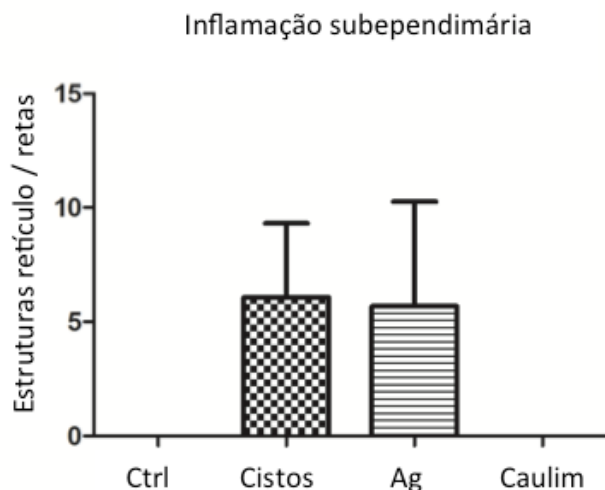


Gráfico 6. Quantificação de infiltrado inflamatório linfocítico na região subependimária, segundo a contagem de retículos de Weibel. Observamos sua ocorrência de modo semelhante nos grupos cistos e antígenos – o que não ocorreu nos grupos controle e caulim.

A imunorreatividade de GFAP, um marcador de reação de astrogliose acompanhou o padrão de gliose periventricular observado na coloração por HE, ocorrendo mais nos grupos cistos, antígenos e caulim do que no grupo controle. A expressão de AQP-4 (aquaporina-4) seguiu o mesmo padrão, como mostra a figura 15.

Comparando-se a imunorreatividade desses marcadores entre os grupos, o grupo controle, apresentou menor expressão de GFAP e AQP-4. Além disso, a imunorreatividade de GFAP foi significativamente superior no grupo antígenos em relação ao grupo cistos (gráfico 7), e a imunorreatividade de AQP-4 foi superior no grupo caulim em comparação ao grupo cistos (gráfico 8).

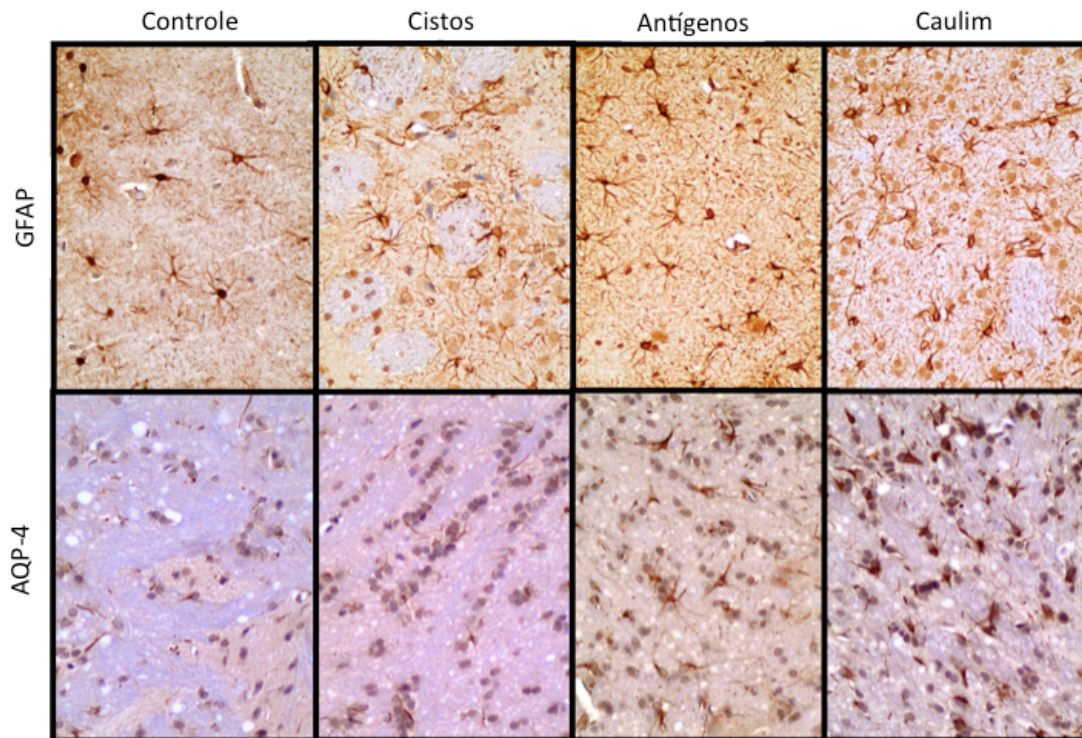


Figura 15. Painel de reatividade imunohistoquímica de GFAP e AQP-4. A expressão dos marcadores é mais intensa nos grupos cistos, antígenos e caulim do que no grupo controle.

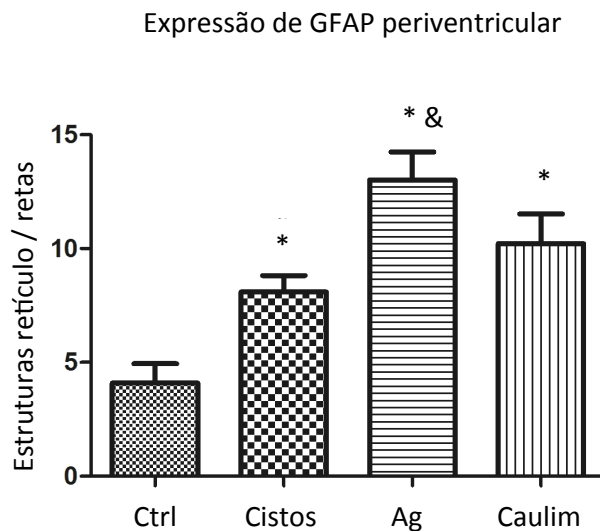


Gráfico 7. Quantificação de células GFAP+ na região periventricular, segundo a contagem de retículos de Weibel. O grupo controle teve menor expressão do marcador que os demais grupos e grupo antígenos apresentou expressão superior à do grupo cistos. \* $p < 0,01$  para controle vs cistos, antígenos e caulim. & $p = 0,01$  para antígenos vs cistos

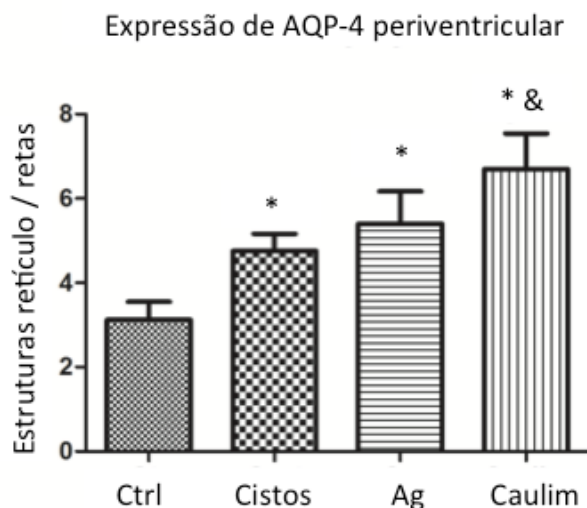


Gráfico 8. Quantificação de células AQP-4+ na região periventricular, segundo a contagem de retículos de Weibel. O grupo controle teve menor expressão do marcador que os demais grupos e grupo antígenos apresentou imunorreatividade superior à do grupo cistos. \* $p < 0,05$  para controle vs cistos, antígenos e caulim. & $p < 0,05$  para caulim vs cistos.

Como, porém, os grupos cistos e antígenos tiveram dois subgrupos – alguns animais foram eutanasiados um mês após as inoculações e os demais, seis meses após as inoculações, comparamos a imunorreatividade por subgrupos, tendo como padrão de imunorreatividade positiva o grupo caulim. Desta forma, observamos uma menor imunorreatividade de GFAP nos animais mantidos vivos até os seis meses em comparação com aqueles mantidos vivos apenas até um mês (gráfico 9). O inverso se deu com a imunorreatividade de AQP-4: os animais mantidos vivos até os seis meses apresentaram maior expressão de AQP-4 que os animais eutanasiados com um mês de inoculação (gráfico 10).



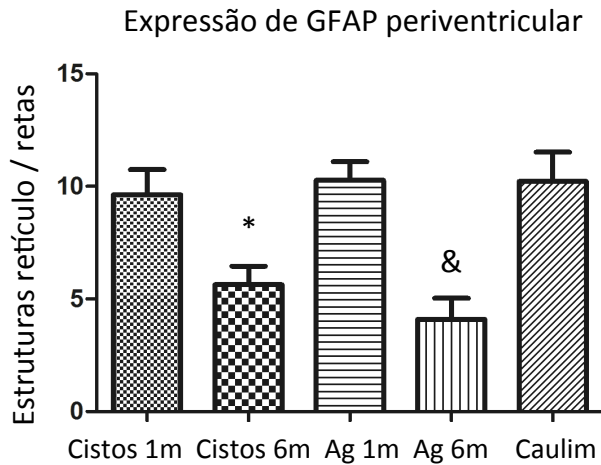


Gráfico 9. Quantificação de células GFAP+ na região periventricular, segundo a contagem de retículos de Weibel. Os subgrupos de 6 meses de observação apresentaram menor imunorreatividade de GFAP do que seus subgrupos de 1 mês de observação. \*p = 0,042 para cistos 6 meses vs 1 mês. &p = 0,008 para antígenos 6 meses vs 1 mês.

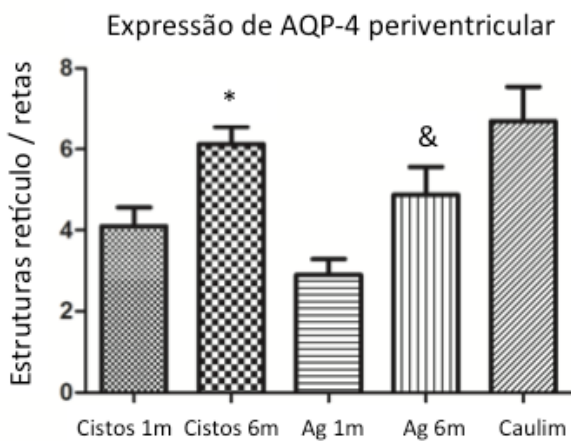


Gráfico 10. Quantificação de células AQP-4+ na região periventricular, segundo a contagem de retículos de Weibel. Os subgrupos de 6 meses de observação apresentaram maior imunorreatividade de AQP-4 do que seus subgrupos de 1 mês de observação. \*p = 0,016 para cistos 6 meses vs 1 mês. &p = 0,047 para antígenos 6 meses vs 1 mês.

### 5.5. Correlação entre os parâmetros

Os parâmetros de peso, alterações comportamentais (movimentos horizontais e tempo de centro) e volume ventricular foram cruzados entre si considerando cada unidade experimental individualmente. As correlações de alterações da análise morfométrica com os demais parâmetros foram realizados considerando os grupos e subgrupos experimentais em razão do cegamento da morfometria para as unidades experimentais.

Encontramos correlação negativa entre o volume ventricular e o peso dos animais no sexto mês de observação: quanto maior o volume ventricular, menor o peso dos animais ( $R = -0,642$ ,  $p = 0,018$ ). As demais correlações de unidades experimentais individuais não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Já na comparação de subgrupos, encontramos correlação negativa entre a imunorreatividade de aquaporina-4 e movimentos horizontais no teste comportamental ( $R = -1$ ). As demais correlações não apresentaram diferença estatística. A tabela 6 apresenta os valores de R para as correlações testadas.

Tabela 6. Valor de R para correlações testadas entre parâmetros de peso, comportamento, volume ventricular e imunorreatividade de GFAP e AQP-4

Correlação	R	p
Peso vs comportamento (1 mês)	0,074	0,657
Peso vs volume ventricular (1 mês)	-0,307	0,061
Comportamento vs volume ventricular (1 mês)	-0,259	0,117
Peso vs comportamento (6 meses)	0,542	0,085
<b>Peso vs volume ventricular (6 meses)</b>	<b>-0,642</b>	<b>0,018</b>
Comportamento vs volume ventricular (6 meses)	-0,291	0,385
GFAP vs peso	-0,600	0,285
GFAP vs comportamento	0,300	0,624
GFAP vs volume ventricular	-0,300	0,624
AQP-4 vs peso	0,100	0,873
<b>AQP-4 vs comportamento</b>	<b>-1,000</b>	<b>&lt; 0,01</b>
AQP-4 vs volume ventricular	0,800	0,104

\* As variáveis de comportamento se referem à movimentação horizontal, medida pelo número de linhas cruzadas na caixa.

\*\* As comparações de marcadores imunoistoquímicos consideraram os valores médios dos subgrupos cistos 1 mês, cistos 6 meses, antígenos 1 mês, antígenos 6 meses, e caulim.

## 6. Discussão

A reprodução de doenças em modelos experimentais é bastante útil para a compreensão dos mecanismos das doenças e para experimentação de novas abordagens terapêuticas. No caso da neurocisticercose, há grande variabilidade da apresentação clínica e da resposta individual ao tratamento – provavelmente relacionadas a fatores imunológicos dos pacientes (Cárdenas et al., 2014). Assim, investigações clínicas sistematizadas se tornam difíceis pela heterogeneidade da doença, e, portanto, diferentes modelos experimentais têm sido criados nos últimos anos e fornecido informações úteis sobre a imunopatogênese da neurocisticercose (Arora et al., 2017).

Já a reprodução experimental da hidrocefalia tem um histórico maior, com mais robustez e consistência de informações, principalmente com o uso do caulim (Del Bigio, 1993) – silicato de alumínio. O caulim é uma argila branca utilizada na indústria de papel e cerâmica e empregada também como excipiente de formulações farmacêuticas. Sua injeção na cisterna magna induz uma reação inflamatória nas cisternas basais, causando obstrução à circulação do líquido e, conseqüentemente, hidrocefalia. A hidrocefalia induzida pelo caulim, porém, é muito rápida e leva a alterações cognitivas e de marcha dentro de até 4 semanas após a injeção (Khan et al., 2006; Jusué-Torres et al., 2016), com altas taxas de mortalidade dependendo da dose e concentração da suspensão (Del Bigio et al., 1997; Lopes et al., 2009). Assim, é diferente do padrão de hidrocefalia crônica frequentemente observado na prática clínica, como é o caso da hidrocefalia de pressão normal e em alguns casos de hidrocefalia na neurocisticercose. Neste sentido, outros modelos de hidrocefalia crônica, também chamada de arrastada ou compensada, têm sido desenvolvidos, como, por exemplo, através da injeção

de caulim diretamente no ventrículo lateral (Shaolin et al., 2015) ou no espaço subaracnoideo da convexidade cerebral (Li et al., 2008; Jusué-Torres et al., 2016).

Nestes modelos, porém, as reações inflamatórias são difusas pelo espaço subaracnoideo e não há obstrução intraventricular da circulação de líquido, como ocorre nas hidrocefalias obstrutivas secundárias a neoplasias ou à própria neurocisticercose.

Em 2012, Matos-Silva e colaboradores, num modelo de neurocisticercose experimental com *T. crassiceps*, inocularam cistos através de trepanação, atravessando o córtex cerebral e atingindo o ventrículo lateral. Como consequência, observaram ventriculomegalia assimétrica, com desvio de linha média (Matos-Silva et al., 2012). Esse modelo experimental continua sendo utilizado para caracterização da resposta inflamatória local e sistêmica (Moura et al., 2016; Milhomem et al., 2018).

Com base na necessidade de desenvolver um modelo de hidrocefalia induzida por neurocisticercose (combinando mecanismos inflamatórios e obstrutivos) e com base na observação da capacidade biológica de *T. crassiceps* em deslocar estruturas intracranianas, produzindo efeito de massa (Alvarez et al., 2010), propusemos o modelo de hidrocefalia induzida pela injeção cisternal de *T. crassiceps* (Hamamoto Filho et al., 2016).

De fato, observamos que o modelo desenvolvido apresentava elementos de inflamação periventricular e de obstrução mecânica (Hamamoto Filho et al., 2017) mas não ficava claro qual dos mecanismos era mais importante para a ocorrência da hidrocefalia. Por isso, no trabalho ora apresentado, propusemos a injeção de antígenos do parasita, com o intuito de replicar a resposta

inflamatória sem a contrapartida da obstrução mecânica.

Além disso, a observação empírica de que os animais com hidrocefalia induzida por neurocisticercose sobreviviam sem um adoecimento significativo se comparados aos animais com hidrocefalia por caulim, motivou o estudo das alterações de longo prazo, com a hipótese de que alguns mecanismos compensatórios estariam envolvidos no processo fisiopatológico.

A variação do peso dos animais neste trabalho mostrou que, de fato, o comprometimento ponderal dos animais com hidrocefalia induzida pelos cistos de *T. crassiceps* é tardio, se comparado com os animais com hidrocefalia por caulim. No primeiro mês de avaliação, o peso médio dos animais do grupo caulim foi 22% menor que o peso médio do grupo controle, enquanto os animais dos grupos cistos e antígenos tinham peso semelhante. Já no sexto mês, o peso médio dos animais do grupo cistos foi 19% inferior ao do grupo controle. Neste momento, o peso médio dos animais do grupo antígenos não teve diferença significativa em relação ao grupo controle. Como o grupo cistos apresentava maior volume ventricular que o grupo antígenos, a hidrocefalia foi a responsável pelo menor ganho de peso dos animais do grupo cistos, como já bem demonstrado na literatura a partir de aferições mais frequentes do peso dos animais (Khan et al., 2006; Lopes et al., 2009; Wang et al., 2011; Olopade et al., 2012). Para Del Bigio, a dificuldade de ganho de peso é o sinal mais precoce da hidrocefalia experimental crônica, e pode estar relacionada à lesão do centro do apetite no hipotálamo, como consequência do estiramento do terceiro ventrículo (Del Bigio et al., 2003).

As alterações comportamentais avaliadas pelo teste de campo aberto mostraram que os animais do grupo caulim tiveram desempenho inferior no

primeiro mês em comparação com os animais dos grupos cistos e antígenos em relação à exploração do ambiente avaliada pelo número de linhas cruzadas horizontalmente. Embora os três grupos não tenham diferido estatisticamente do grupo controle, é de se notar que os animais dos grupos cistos e antígenos tenham tido mais movimentação horizontal que os animais do grupo controle, os quais, por sua vez, em números absolutos, tenham se movimentado mais que os animais do grupo caulim. Já na avaliação de seis meses pós-inoculações, o dado que mais chama a atenção é o tempo de permanência no centro do campo, com os animais do grupo cisto permanecendo significativamente mais tempo que os dos grupos antígenos e controle, conquanto todos eles tenham aumentado este tempo na comparação com o primeiro mês pós-inoculação.

Estudos anteriores demonstraram comprometimento comportamental em animais hidrocefálicos, com redução do efeito de aprendizagem e redução da atividade exploratória, prejudicados ainda mais com disfunções da capacidade motora (Del Bigio et al., 1997; Del Bigio et al., 2003; Olopade et al., 2012; Garcia et al., 2017). Porém, no conjunto de diferentes parâmetros de diferentes testes comportamentais, é frequente o achado de não haver correlação entre alguns parâmetros e o grau de dilatação ventricular, bem como inconsistência de performance em diferentes parâmetros (Del Bigio et al., 1997). Uma possível explicação para eventuais discrepâncias nos parâmetros comportamentais pode ser devida à expressão de neurotransmissores relacionados à ansiedade em ratos com hidrocefalia (Hwang et al., 2011). Níveis elevados de ansiedade podem causar medo do novo, reduzindo a atividade exploratória, enquanto níveis menores podem determinar aumento de curiosidade, aumentando a atividade exploratória (Griebel et al., 1993). Assim, em nossos animais, não podemos

desconsiderar que, além do efeito da hidrocefalia, o efeito da exposição ao estresse de inoculações, à realização de ressonância magnética e ao próprio teste comportamental pode ter contribuído para as variações de desempenho. No grupo caulim, a ansiedade causada pela hidrocefalia pode ter reduzido a atividade exploratória, enquanto nos animais do grupo cisto e caulim, no primeiro mês, com hidrocefalia leve ou sem hidrocefalia, a exposição ao estresse inflamatório do sistema nervoso central pode ter aumentado a curiosidade, determinando mais movimentação no plano horizontal.

Com relação às alterações de ressonância magnética, os dados deste trabalho confirmam os achados anteriores desta linha de pesquisa, confirmando o caráter lentamente evolutivo da hidrocefalia induzida por neurocisticercose. As medidas volumétricas ventriculares são consistentemente mais elevadas aos seis meses pós-inoculação do que no primeiro mês no grupo cistos. Portanto, o modelo reproduz o caráter evolutivo crônico que se pode observar na hidrocefalia por neurocisticercose e em outras formas de hidrocefalia em humanos.

Nos animais do grupo, antígenos, observamos a ocorrência de hidrocefalia em apenas dois animais, cujos volumes ventriculares ( $5,14\text{mm}^3$  e  $6,75\text{mm}^3$ ) foram pouco maiores que o valor de corte para considerar hidrocefalia ( $5\text{mm}^3$ ), ainda mais se comparados aos grandes volumes observados nos grupos caulim e cistos. Assim, pela análise de ressonância magnética, pode-se questionar o papel da inflamação para a ocorrência de hidrocefalia neste modelo experimental. Por outro lado, a concentração proteica ( $2,86\text{mg/ml}$ ) pode ter sido pequena para desencadear hidrocefalia, especialmente se comparada com a concentração utilizada de caulim ( $25\% = 250\text{mg/ml}$ ).

A distribuição de cistos nos compartimentos liquóricos seguiu padrão semelhante ao que ocorre em seres humanos: cistos nas cisternas da base, na fossa posterior, na cisterna magna, na convexidade cerebral e até no espaço subaracnoideo da medula espinhal (Bazan et al., 2016; Marcin-Sierra et al., 2017). Considerando-se que os cistos foram injetados apenas na cisterna magna, resta evidente que os cistos de *T. crassiceps* se movem nos compartimentos de líquido dos ratos, à semelhança do que frequentemente se observa em seres humanos, com documentações radiológicas e intraoperatórias da migração de cistos pelo sistema ventricular (García e Del Brutto, 2003; Figueroa et al., 2011).

As alterações morfológicas demonstram que a inoculação de agentes estranhos no espaço subaracnoideo, seja químico, como caulim, ou biológico, como cistos e caulim, desencadeia reações inflamatórias periventriculares, com formação, a posteriori, de astrogliose reativa periventricular. No entanto, a perpetuação da resposta inflamatória parece mais relacionada à interação do parasita vivo no sistema nervoso central, haja vista a maior quantidade de células inflamatórias no grupo cistos. O predomínio de células de linhagem mononuclear é esperado para inflamação crônica, embora não possamos desconsiderar o provável influxo inicial de polimorfonucleares de fase aguda, como observado em outros trabalhos com inoculação intracraniana de *T. crassiceps* (Matos-Silva et al., 2012; Moura et al., 2016). A manutenção da viabilidade de cistos parece relacionada à capacidade de o parasita evadir da resposta imune do hospedeiro, desviando a resposta inflamatória de um padrão Th1 (mais destrutivo) para um padrão Th2 (mais permissivo) (Alvarez et al., 2010; Milhomem et al., 2018).

No plexo coroide, observamos edema e infiltração leucocitária –



principalmente nos grupos cistos e caulim, os grupos hidrocefálicos. O edema de plexo coroide pode ser, portanto, uma consequência da hidrocefalia, como bem documentado em antigas observações de hidrocefalia experimental (Ho et al., 1976; Del Bigio 1993). Sob hidrocefalia, o plexo coroide também apresenta inflamação e modificações moleculares, como alteração na expressão de AQP-1 (aquaporina-1) Oshio e colaboradores (2005) observaram que animais nocaute para AQP-1 no plexo coroide apresentaram menores taxas de produção de líquido, ventriculomegalia e de pressão intracraniana, sugerindo que a AQP-1 possa ser menos expressa em condições de hidrocefalia, num mecanismo compensatório (Oshio et al., 2005). Posteriormente, demonstrou-se que, em vigência de hidrocefalia, as moléculas de aquaporina-1 são interiorizadas pelas células epiteliais do plexo coroide (Wang et al., 2011).

A infiltração linfocitária no plexo coroide também parece mais relacionada à hidrocefalia que ao recrutamento de células dirigidas a combater os cistos de *T. crassiceps*. Num modelo de infecção por *Mesocostoides corti*, a cinética de migração leucocitária mostra que o epêndima e a barreira hematoencefálica junto aos vasos piais são os sítios preferenciais de extravasamento plasmático e infiltração de leucócitos, enquanto o plexo coroide mantém a integridade de proteínas do complexo juncional, com menor ativação de metaloproteinases de matriz (Alvarez et al., 2010). Essas informações são coerentes com o padrão ora observado de inflamação subependimária nos animais do grupo cistos e antígenos.

Numa primeira análise, o padrão de imunorreatividade de GFAP e AQP-4, predominantemente na região periventricular, que apresentou astrogliose reativa, era esperado, pois o GFAP é um marcador de reação astrocitária e a AQP-

4 se colocaliza com o GFAP, já que é expressa nos pés vasculares dos astrócitos (Tourdias et al., 2009). Porém a análise de subgrupos (1 mês vs 6 meses) mostrou dados conflitantes: os animais mantidos vivos até os 6 meses apresentaram menor taxa de positividade de GFAP e maior taxa de positividade de AQP-4 que os animais eutanasiados com um mês pós-inoculação, sendo que se esperava o mesmo comportamento para ambos – maior imunorreatividade de GFAP acompanhada de maior imunorreatividade de AQP-4 (Gohara et al., 2010).

Entretanto, Eide e Hansson (2018) observaram um aumento de astrogliose e redução na expressão de AQP-4 no córtex cerebral de humanos com hidrocefalia de pressão normal (Eide e Hansson, 2018), de modo semelhante ao que observamos na região periventricular dos animais dos grupos cistos e antígenos eutanasiados um mês após as inoculações: atividade astrocitária mais intensa (marcada pela positividade com GFAP) e proporcionalmente menor expressão de AQP-4 que nos animais mantidos vivos até os 6 meses pós-inoculação. Pode-se questionar se a inflamação direcionada a proteínas de *T. crassiceps* tenha modulado a expressão de AQP-4 de maneira diferente do que se observou até agora nos modelos com caulim, pois os animais do grupo antígenos, mesmo não tendo desenvolvido hidrocefalia, também aumentaram a expressão de AQP-4.

A AQP-4 está bem estabelecida como molécula de expressão aumentada em vigência de hidrocefalia (Mao et al., 2006) como mecanismo compensatório para aumentar a absorção de água do parênquima cerebral para a vasculatura (Filippidis et al., 2011). Animais nocaute para AQP-4 apresentam graus de hidrocefalia mais graves que animais selvagens (Bloch et al., 2006), animais espontaneamente hidrocefálicos apresentam expressão diferenciada de AQP-4

(Shen et al., 2006), e a expressão de AQP-4 diminuiu após a instalação de *shunts* ventriculares para o tratamento de hidrocefalia (Schmidt et al., 2016). Em humanos, a AQP-4 também é detectada em níveis aumentados no líquido e o parênquima cerebral de pacientes com hidrocefalia (Castañeyra-Ruiz et al., 2013; Skjolding et al., 2013).

A localização da AQP-4 nos pés vasculares dos astrócitos tem chamado a atenção de investigações recentes. É o local de troca de substâncias entre o líquido e o interstício cerebral. Propõe-se que o líquido adentra no parênquima junto a arteríolas pelo espaço de Virchow-Robin, faz a troca de solutos com o parênquima e leva as excretas celulares para o espaço perivenoso, tendo a AQP-4 como carreadora de água entre os astrócitos e os vasos, configurando, assim, o denominado sistema glinfático (Oliveira et al., 2018).

Desordens no sistema glinfático têm sido apontadas na fisiopatologia da hidrocefalia de pressão normal, no desenvolvimento da doença de Alzheimer e de alterações cognitivas após traumatismos crânio-encefálicos (Ringstad et al., 2017). Na fisiopatologia da doença de Alzheimer, por exemplo, há deposição de beta-amiloide no espaço perivascular de Virchow-Robin (Roher et al., 2003). E de modo coerente, Jusué-Torres e colaboradores observaram grande atividade de macrófagos englobando partículas de caulim no espaço de Virchow-Robin num modelo de hidrocefalia induzida por caulim injetado no espaço subaracnoideo da convexidade do cérebro (Jusué-Torres et al., 2016).

Nosso modelo de hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental, portanto, mostrou uma hidrocefalia de evolução progressiva, o que abre perspectivas para o estudo experimental das hidrocefalias crônicas. Diferentemente da hidrocefalia induzida pelo caulim, este modelo experimental

permite a manutenção dos animais vivos por mais tempo: o comprometimento sistêmico é mais tardio – como mostrado pelas curvas de ganho de peso e pelo comportamento relativamente normal no primeiro mês se comparado com os animais do grupo caulim. Estudos com avaliações ponderais mais frequentes poderão caracterizar melhor a dinâmica do retardo de ganho de peso nos animais com hidrocefalia por cistos de *T. crassiceps*. Outros testes comportamentais poderão contribuir para o estudo de comprometimento de força muscular, memória e capacidade de aprendizado.

Demonstramos que inflamação e obstrução mecânica ocorrem neste modelo, a exemplo do que ocorre na hidrocefalia por neurocisticercose na prática clínica. No entanto, as reações inflamatórias desencadeadas pela inoculação de antígenos de *T. crassiceps* não foram suficientes para produzir hidrocefalia. Assim, pode-se assumir que a hidrocefalia nos cistos tenha se devido mais à obstrução mecânica, e o caráter progressivo da instalação da hidrocefalia e do próprio grau de dilatação ventricular deve estar relacionado ao crescimento dos cistos no espaço subaracnoideo – assemelhando-se à degeneração hidrópica observada no crescimento de cistos racemosos em humanos. Porém, como já anteriormente apontado, é possível que a concentração proteica da suspensão antigênica tenha sido muito baixa e novos estudos devem ser conduzidos testando se concentrações proteicas maiores podem produzir hidrocefalia, além da inflamação e gliose periventricular já observadas neste trabalho.

O aumento da expressão de AQP-4 nos animais com 6 meses de inoculação de cistos sugere a participação deste canal de água como via alternativa da absorção do líquido, embora uma correlação estatística não tenha

sido observada (provavelmente em razão da análise de grupo, não individual, e pelo número reduzido da amostra). De todo modo, o aumento da expressão de AQP-4 em animais não hidrocefálicos do grupo antígenos chama a atenção, aventando-se a hipótese de que as reações inflamatórias anti-parasitárias podem mediar um aumento da expressão de AQP-4 que, por sua vez, poderia aumentar o *clearance* de água e compensar parcialmente a hidrocefalia na neurocisticercose, permitindo, finalmente, uma evolução mais arrastada da hidrocefalia.

Quanto às limitações do trabalho, destacamos que o número de grupos, com análise de subgrupos, diminuiu o número de amostras em cada grupo, comprometendo a força estatística das análises. A avaliação cega das alterações histológicas não permitiu correlações individuais de alterações de peso, comportamento e ressonância magnética com lesões teciduais. O teste comportamental, baseado apenas no estudo de campo aberto, não é suficiente para avaliar o comprometimento de funções de memória e aprendizado dos animais. Finalmente, o equipamento de ressonância magnética, de 0,25 T, não permite o estudo detalhado de alterações morfológicas nem de alterações do coeficiente de difusão aparente, frequentemente alterado na hidrocefalia. Esses óbices devem ser minorados em futuras investigações desta linha de pesquisa.

## 7. Conclusões

- ✓ O comportamento dos animais com hidrocefalia induzida por neurocisticercose não é alterado precocemente;
- ✓ O volume ventricular da hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental é de evolução progressiva; e as alterações de ressonância magnética são semelhantes às observadas em humanos;
- ✓ A hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental induz reações inflamatórias e astrocitária periventriculares; as alterações do plexo coróide são semelhantes às observadas nos modelos de hidrocefalia por caulim;
- ✓ A imunorreatividade de GFAP foi maior no primeiro mês pós-inoculação que no sexto mês;
- ✓ A imunorreatividade de AQP-4 foi maior no sexto mês pós-inoculação que no primeiro mês e também ocorreu em animais que receberam inoculação antigênica mas não desenvolveram hidrocefalia.

## 8. Referências

1. Abbot NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004; 45(4):545-552.
2. Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol.* 2018; 135(3):387-407.
3. Agapejev S, Souza AF, Bazan R, Faleiros ATS. Clinical and evolutive aspects of hydrocephalus in neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65(3A):674-680.
4. Agapejev S. Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003; 61(3B):822-828.
5. Agapejev S. Neurocysticercosis: the enigmatic disease. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2011; 11(4):261-284.
6. Alroy KA, Arroyo G, Gilman RH, Gonzalez-Gustavson E, Gallegos L, Gavidia CM, et al. Carotid *Taenia solium* Oncosphere Infection: A Novel Porcine Neurocysticercosis Model. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99(2):380-387.
7. Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 2010; 137(3):359-372.
8. Alvarez JI, Rivera J, Teale JM. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(4):e218.
9. 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):12-113.
10. 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.
11. 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.
12. Amelot A, Faillot T. Hydrocephalus and neurocysticercosis: cases illustrative of three distinct mechanisms. *J Clin Neurol.* 2014; 10:363-366.
13. Arora N, Tripathi S, Kumar P, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol.* 2017; 39(7):e12439.
14. Barrinagarrementeria F, Cantú C. Frequency of cerebral arteritis in subarachnoid cysticercosis. An angiographic study. *Stroke* 1998; 29(1):123-125.
15. Bayston R. Hydrocephalus shunt infections. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 34(suppl A):75-84.

16. 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.
17. Bazan R, Odashima NS, Luvizutto GJ, Hamamoto Filho PT, Zanini MA, Takayanagui OM. Analysis of cerebrospinal fluid in racemose form of neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015; 73(10):852-855.
18. Bergsneider M, Molly LT, Lee JH, King WA, Frazee JG. Endoscopic management of cysticercal cysts within the lateral and third ventricles. *J Neurosurg*. 2000; 92:14-23.
19. Bhattarai R, Carabin H, Flores-Rivera J, Corona T, Proaño JV, Flisser A, et al. Pre-hospitalization, hospitalization, and post-hospitalization costs of patients with neurocysticercosis treated at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) in Mexico City, Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018; 60:e20.
20. Bloch O, Auguste KI, Manley GT, Verkman AS. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metabol* 2006; 26:1527-1537.
21. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*. 2014; 11:10.
22. Burr CW, McCarthy DJ. Acute internal hydrocephalus. A clinical and pathological study. *J Exp Med* 1900; 5:195-204.
23. Cantey PT, Coyle CM, Sorvillo FJ, Wilkins PP, Starr MC, Nash TE. Neglected parasitic infections in the United States: cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 90(5):805-809.
24. Cárdenas G, Jung H, Ríos C, Fleury A, Soto-Hernández JL. Severe cysticercal meningitis: clinical and imaging characteristics. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(1):121-125.
25. Cárdenas G, Fragoso G, Roseti M, Uribe-Figueroa L, Rangel-Escareño C, Saenz B, et al. Neurocysticercosis: the effectiveness of the cysticidal treatment could be influenced by the host immunity. *Med Microbiol Immunol*. 2014; 203(6):373-381.
26. Cardona AE, Gonzalez PA, Teale JM. 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 Immunol*. 2003; 71(5):2634-2642.
27. Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, Teale JM. 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(2):995-1002.
28. Cardona AE, Teale JM. Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *J Immunol*. 2002; 169(6):3163-3171.
29. Carpio A, Fleury A, Romo ML, Abraham R. Neurocysticercosis: the good, the bad, and the missing. *Expert Rev Neurother*. 2018; 18(4):289-301.



30. Carrillo-Mezo R, Lara-García J, Arroyo M, Fleury A. Relevance of 3D magnetic resonance imaging sequences in diagnosing basal subarachnoid neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2015; 152:60-65.
31. Castañeyra-Ruiz L, González-Marrero I, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz A, Paz-Carmona H, Castañeyra-Perdomo A, et al. Aquaporin-4 expression in the cerebrospinal fluid in congenital human hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS.* 2013; 10(1):18.
32. Chimelli L, Lovalho AF, Takayanagui OM. Neurocysticercosis: contribution of autopsies in the consolidation of mandatory notification in Ribeirão Preto-SP, Brazil. 1998; 56(3B):577-584.
33. Chowdhury N, Saleque A, Sood NK, Singla LD. Induced neurocysticercosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) produces clinical signs and lesions similar to natural disease in man. *Scientific World Journal.* 2014;2014:248049.
34. Colli BO, Carlotti Jr CG, Assirati Jr JA, Machado HR, Valença M, Amato MC. Surgical treatment of cerebral cysticercosis: long-term results and prognostic factors. *Neurosurg Focus* 2002; 12(6):e3.
35. Colli BO, Martelli N, Assirati Jr JA, Machado HR, Salvarani CP, Sassoli VP, et al. Cysticercosis of the central nervous system. I. Surgical treatment of cerebral cysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 1994; 53:166-186.
36. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White Jr AC, et al. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(5):e1500.
37. Cuetter AC, Andrews RJ. Intraventricular neurocysticercosis: 18 consecutive patients and review of the literature. *Neurosurg Focus* 2002; 12(6):e5.
38. Cuetter AC, Garcia-Bobadilla J, Guerra LG, Martinez FM, Kaim B. Neurocysticercosis: focus on intraventricular disease. *Clin Infec Dis.* 1997; 24:157-164.
39. Cushing H, Bordley Jr J. Observations on experimentally induced choked disc. *Johns Hopk Hosp Bull* 1909; 20:95-101.
40. Dandy WE, Blcackfan KD. Internal hydrocephalus. An experimental, clinical and pathological study. *Am J Dis Child.* 1914; 8:406-482.
41. Dandy WE. Extirpation of the choroid plexus of the lateral ventricles in communicating hydrocephalus. *Ann Surg.* 1918; 68:569-579.
42. DeGiorgio CM, Houston I, Oviedo S, Sorvillo F. Deaths associated with cysticercosis. Report of three cases and review of the literature. *Neurosurg Focus.* 2002; 12(6):e2.
43. Del Bigio MR. Neuropathological changes caused by hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 1993; 85:573-585.
44. Del Bigio MR, Crook CR, Buist R. Magnetic resonance imaging and behavioral analysis of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus: pre- and postshunting observations. *Exp Neurol* 1997;148(1):256-264.
45. Del Bigio M, Khan O, Enno T, McPhee L. Kaolin-induced hydrocephalus in the newborn rat. *Cerebrospinal Fluid Res* 2004; 1(suppl 1):S56.

46. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol.* 2003; 53(3):337-346.
47. Devleeschauwer B, Allepuz A, Dermauw V, Johansen MV, Laranjo-González M, et al. *Taenia solium* in Europe: still endemic? *Acta Trop.* 2017; 165:96-99.
48. Dewan MC, Rattani A, Mekary R, Glancz LJ, Yunusa I, Baticulon RE, et al. Global hydrocephalus epidemiology and incidence: systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg.* 2018; ahead of print.
49. Di Rocco C, Massimi L, Tamburrini G. Shunts vs endoscopic third ventriculostomy in infants: are there different types and/or rates of complications? A review. *Childs Nerv Syst.* 2006; 22:1573-1589.
50. Eide PK, Hansson HA. Astrogliosis and impaired aquaporin-4 and dystrophin systems in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018; 44(5):474-490.
51. Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. in: Palacios E, Rodriguez-Carbajal J, Taveras JM (Eds.) *Cysticercosis of the central nervous system.* Charles C Thomas, Springfield; 1983: 27-54.
52. Estañol B, Corona T, Abad P. A prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1986; 49(10):1131-1134.
53. Fabiani S, Bruschi F. Neurocysticercosis in Europe: still a public health concern not only for imported cases. *Acta Trop.* 2013; 128(1):18-26.
54. Figueroa JJ, Davis LE, Magalhaes A. Extraparenchymal neurocysticercosis in Albuquerque, New Mexico. *J Neuroimaging.* 2011; 21(1):38-43.
55. Filippidis AS, Kalani MY, Rekate HL. Hydrocephalus and aquaporin: lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst.* 2011; 27(1):27-33.
56. Flexner S. Experimental cerebro-spinal meningitis in monkeys. *J Exp Med* 1907; 9:142-167.
57. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciotto 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.
58. Fleury A, García JM, Aguerrebere PV, Durán MS, Rodríguez PB, Larralde C, et al. Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(8):e805.
59. Fleury A, Sciotto E, Aluja A, Carpio A. Cysticercosis: a preventable, but embarrassing neglected disease still prevalent in non-developed countries. In: Sing A (eds). *Zoonoses – infections affecting humans and animals.* Springer, Dordrecht; 2015: 335-354.
60. Fleury A, Trejo A, Cisneros H, García-Navarrete R, Villalobos N, Hernández M, et al. *Taenia solium*: development of an experimental model of porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(8):e0003980.

61. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 2003; 87(1):43-51.
62. Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun.* 1998; 66(2):760-764.
63. Garcia CAB, Catalão CHR, Machado HR, Júnior IM, Romeiro TH, Peixoto-Santos JE, et al. Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Childs Nerv Syst.* 2017; 33(3):419-428.
64. García HH, Evans CA, Nash TE, Takayanagui OM, White Jr AC, Botero D, et al. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):747-756.
65. García HH, Del Brutto OH. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2003; 87(1):71-78.
66. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* 2014; 13(12):1202-1215.
67. Garcia HH, Pretell Ej, Gilman RH, Martinez SM, Moulton LH, Del Brutto OH, et al. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N Engl J Med.* 2004; 350(3):249-258.
68. Garvey BT, Moyano LM, Ayvar V, Rodriguez S, Gilman RH, Gonzalez AE, et al. Neurocysticercosis among People Living Near Pigs Heavily Infected with Cysticercosis in Rural Endemic Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(2):558-564.
69. Giménez-Roldán S, Diaz F, Esquivel A. Neurocysticercosis and immigration. *Neurologia (Barcelona, Spain).* 2003; 18(7):385-388.
70. Go KG, Stokroos I, Blaauw EH, Zuiderveen F, Molenaar I. Changes of ventricular ependyma and choroid plexus in experimental hydrocephalus, as observed by scanning electron microscopy. *Acta Neuropathol.* 1976; 34(1):55-64.
71. Goel RK, Ahmad FU, Vellimana AK, Suri A, Chandra PS, Kumar R, et al. Endoscopic management of intraventricular neurocysticercosis. *J Clin Neurosci.* 2008; 15:1096-1101.
72. GoharaT, Ishida K, Nakakimura K, Yoshida M, Fukuda S, Matsumoto M, et al. Temporal profiles of aquaporin 4 expression and astrocyte response in the process of brain damage in fat embolism model in rats. *J Anesth.* 2010; 24(2):225-233.
73. Göngora-Rivera F, Soto-Hernández JL, González Esquivel D, Cook HJ, Márquez-Caraveo C, Hernández Dávila R, et al. Albendazole trial at 15 or 30 mg/kg/day for subarachnoid and intraventricular cysticercosis. *Neurology.* 2006;66(3):436-438.
74. Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol.* 1993; 4(6):637-644.

75. Griffith Jr JQ, Jeffers WA, Lindauer MA. A study of the mechanism of hypertension following intracisternal kaolin injection in rats; leucocytic reaction and effect on lymphatic absorption. *Amer J Physiol* 1935; 113:285-290.
76. Griper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease – a review. *Acta Trop*. 2017; 166:218-224.
77. Guarda KX, Costa-Cruz JM, Barcelos ISC. Seroprevalence of human cysticercosis in Jataí, Goiás state, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2018; 22(2):146-149.
78. 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):119-123.
79. Hamamoto Filho PT, Zanini MA, Botta FP, Rodrigues MV, Bazan R, Vulcano LC, et al. Development of an experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus. Pilot study. *Acta Cir Bras*. 2015; 30(12):819-823.
80. Harris NG, Jones HC, Williams CR. MR imaging for measurements of ventricles and cerebral cortex in postnatal rats (H-Tx strain) with progressive inherited hydrocephalus. *Exp Neurol* 1992; 118(1):1-6.
81. Herrador Z, Fernandez-Martinez A, Benito A, Lopez-Velez R. Clinical Cysticercosis epidemiology in Spain based on the hospital discharge database: What's new?. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(4):e0006316.
82. Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* 2014; 11:26.
83. Hochwald GM. Animal models of hydrocephalus: recente developments. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 178:1-11.
84. Hotez PJ. Neglected Infections of Poverty in the United States and Their Effects on the Brain. *JAMA Psychiatry* 2014; 71(10):1099-1100.
85. Hunter E, Cliff M, Armstrong M, Manji H, Jäger HR, Chiodini P, et al. Active neurocysticercosis at the Hospital for Tropical Diseases, London: a clinical case series. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2018; 112(7):326-334.
86. Husain M, Jha DK, Rastogi N, Gupta RK. Neuro-endoscopic management of intraventricular neurocysticercosis (NCC). *Acta Neurochir (Wien)* 2007; 149:341-346.
87. Hwang YS, Shim I, Chang JW. Anxiety responses and neurochemical changes in kaolin-induced rat modelo of hydrocephalus. *J Neurosurg Pediatr*. 2011; 7(4):401-407.
88. Ingraham FD, Alexander Jr E, Matson DD. Experimental hydrocephalus. *J Neurosurg* 1947; 4:164-176.
89. Ishida MM, Almeida MS, Espíndola NM, Iha A, Pereira DA, Souza JG, et al. Seroepidemiological study of human cysticercosis with blood samples collected on filter paper, in Lages, State of Santa Catarina, Brazil, 2004-2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(3):339-343.

90. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The glymphatic system: a beginner's guide. *Neurochem Res.* 2015; 40(12):2583-2599.
91. Jusué-Torres I, Jeon LH, Sankey EW, Lu J, Vivas-Buitrago T, Crawford JA, et al. A novel experimental animal model of adult chronic hydrocephalus. *Neurosurgery* 2016; 79(5):746-756.
92. Kahle KT, Kulkarni AV, Limbrick Jr DD, Warf BC. Hydrocephalus in children. *Lancet* 2016; 387(10020):788-799.
93. Khan OH, Enno TL, Del Bigio MR. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. *Exp Neurol.* 2006; 200(2):311-320.
94. Kimura-Hayama ET, Higuera JA, Corona-Cedillo R, Chávez-Macías L, Perochena A, Quiroz-Rojas LY, et al. Neurocysticercosis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2010; 30(6):1705-1719.
95. Klesidis T, Tsiodras S. Extraparenchymal neurocysticercosis in the United States. *Am J Med Sci* 2012; 344(1):79-82.
96. 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.
97. Lerner A, Shiroishi MS, Zee CS, Law M, Go JL. Imaging of neurocysticercosis. *Neuroimaging Clin N Am* 2012; 22(4):659-676.
98. Li J, McAllister JP, Shen Y, Wagshul ME, Miller JM, Egnor MR, et al. Communicating hydrocephalus in adult rats with kaolin obstruction of the basal cisterns or the cortical subarachnoid space. *Exp Neurol.* 2008; 211(2):351-61.
99. Lopes LS, Machado HR, Lachat JJ. Study of corpus callosum in experimental hydrocephalic wistar rats. *Acta Cir Bras* 2003; 19(suppl 5):10-14).
100. Lopes LS, Slobodian I, Del Bigio MR. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. *Exp Neurol.* 2009; 219(1):187-196.
101. Loyo M, Kleriga E, Estanol B. Fourth ventricular cysticercosis. *Neurosurgery* 1980; 7:456-458.
102. Mahale RR, Mehta A, Rangasetty S. Extraparenchymal (racemose) neurocysticercosis and its multitude manifestations: a comprehensive review. *J Clin Neurol* 2015; 11(3):203-211.
103. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(11):2929-2936.
104. Marcin-Sierra M, Arroyo M, Torres MC, Cruz NR, Hernández FG, Taboada D, et al. Extraparenchymal neurocysticercosis: demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(6):e0005646.
105. Martins-Melo FR, Ramos Jr AN, Cavalcanti MG, Alencar CH, Heukelbach J. Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000-2011: epidemiology of a neglected neurologic cause of death. *Acta Tropica* 2016; 153:128-136.

106. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VB, Vinaud MC. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012; 70(4):287-292.
107. Matushita H, Pinto FC, Cardeal DD, Teixeira MJ. Hydrocephalus in neurocysticercosis. *Childs Nerv Syst.* 2011; 27(10):1709-1721.
108. McCormick GF, Zee CS, Heiden J. Cysticercosis cerebri. Review of 127 cases. *Arch Neurol.* 1982; 39:534-539.
109. Milhomem AC, Souza AJS, Silva HM, Vinaud MC, Oliveira MAP, Machado JR, et al. Histopathologic aspects of experimental cysticercosis and in situ cytokines profile in C57BL/6 mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2018; 76(5):339-345.
110. Millen JW. Experimental hydrocephalus. *Proc R Soc Med* 1956; 49:980-982.
111. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. STAT6<sup>-/-</sup> mice exhibit decreased cells with alternatively activated macrophage phenotypes and enhanced disease severity in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol.* 2011; 232(1-2):26-34.
112. Mishra BB, Mishra PK, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol.* 2006; 181(1-2):46-56.
113. Mishra PK, Teale JM. Transcriptome analysis of the ependymal barrier during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2012; 9:141.
114. Morales J, Martínez JJ, Villalobos N, Henrnadez M, Ramírez R, Salgado Estrada B, et al. Persistent *Taenia solium* cysticercosis in the state of Morolos, Mexico: human and porcine seroprevalence. *J Parasitol.* 2018, ahead of print.
115. Moura VBL, Lima SB, Matos-Silva H, Loyola PR, Lino RS. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology* 2016; 143(3):334-342.
116. Moyano LM, O'Neal SE, Ayvar V, Gonzalez G, Gamboa R, Vilchez P, et al. High prevalence of asymptomatic neurocysticercosis in an endemic rural community in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(12):e0005130.
117. Muir RT, Wang S, Warf BC. Global surgery for pediatric hydrocephalus in the developing world: a review of the history, challenges, and future directions. *Neurosurg Focus.* 2016; 41(5):e11.
118. Mwanjali G, Kihamia C, Kakoko DV, Lekule F, Ngowi H, Johansen MV, et al. Prevalence and Risk Factors Associated with Human *Taenia Solium* Infections in Mbozi District, Mbeya Region, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(3):e2102.
119. Mwape KE, Blocher J, Wiefek J, Schmidt K, Dorny P, Praet N, Chiluba C, et al. Prevalence of Neurocysticercosis in People with Epilepsy in the Eastern Province of Zambia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(8):e0003972.
120. Nash TE, Singh G, White AC, Rajshekhar V, Loeb JA, Proaño JV, et al. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology* 2006; 67(7):1120-1127.

121. Nash TE, Ware JM, Mahanty S. Intraventricular Neurocysticercosis: Experience and Long-Term Outcome from a Tertiary Referral Center in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(6):1755-1762.
122. O'Neal SE, Flecker RH. Hospitalization Frequency and Charges for Neurocysticercosis, United States, 2003–2012. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(6):969-976.
123. Oliveira LM, Figueiredo EG, Peres CMA. The glymphatic system: a review. *Arq Bras Neurocir.* 2018, ahead of print.
124. Oliveira RS, Viana DC, Colli BO, Rajshekhar V, Salomão JFM. Pediatric neurocysticercosis. *Childs Nerv Syst.* 2018, ahead of print.
125. Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén AL. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids Barriers CNS* 2012;9:19.
126. Oreskovic D, Klarica M. A new look at cerebrospinal fluid movement. *Fluids Barriers CNS.* 2014; 11:16.
127. Oreskovic D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev.* 2010; 64(2):241-262.
128. Oreskovic D, Rados M, Klarica M. New concepts of cerebrospinal fluid physiology and development of hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg.* 2017; 52(6):417-425.
129. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J.* 2005; 19(1):76-78.
130. Oowler BK, Pitham T, Wang D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7:15.
131. Paiva ALC, Araujo JLV, Ferraz VR, Lovato RM, Pedrozo CAG, Aguiar GB, et al. Surgical treatment of neurocysticercosis. Retrospective cohort study and an illustrative case report. *Sao Paulo Med J.* 2017; 135:146-149.
132. Plog BA, Nedergaard M. The glymphatic system in CNS health and disease: past, present and future. *Annu Rev Pathol.* 2018; 13:379-394.
133. Proaño JV, Madrazo I, Avelar F, López-Félix B, Díaz G, Grijalva I. Medical treatment for neurocysticercosis characterized by giant subarachnoid cysts. *N Engl J Med.* 2011; 345(12):879-885.
134. Proaño JV, Torres-Corzo J, Rodríguez-Dalla Vecchia R, Guizar-Sahagun G, Rangel-Castilla L. Intraventricular and subarachnoid basal cisterns neurocysticercosis: a comparative study between traditional treatment versus neuroendoscopic surgery. *Childs Nerv Syst.* 2009; 25:1467-1475.
135. Psarros TG, Krumerman J, Coimbra C.. Endoscopic management of supratentorial ventricular neurocysticercosis: case series and review of the literature. *Minim Invasive Neurosurg.* 2003; 46:331-334.

136. Rangel-Castilla L, Serpa JA, Gopinath SP, Graviss EA, Diaz-Marchan P, White Jr AC. Contemporary neurosurgical approaches to neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80:373-378.
137. Ranjan M, Konar SK, Somanna S, Bhagavatula ID, Ashwathnarayana CB. Endoscopic intervention for the fourth ventricular neurocysticercal cyst: What should be the optimum therapeutic approach? *Br J Neurosurg.* 2014; 28:626-630.
138. Ringstad G, Vatnehol SAS, Eide PK. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain.* 2017; 140(10):2691-2705.
139. Rodríguez-Morales AJ, Yepes-Echeverri MC, Acevedo-Mendoza WF, Marín-Rincón HA, Culquichicón C, Parra-Valencia E, et al. Mapping the residual incidence of taeniasis and cysticercosis in Colombia, 2009–2013, using geographical information systems: Implications for public health and travel medicine. *Travel Med Infect Dis.* 2018; 22:51-57.
140. Rodríguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojail R, Satoskar AR, Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun.* 2003; 71(3):1247-1254.
141. Roher AE, Kuo YM, Esh C, Knebel C, Weiss N, Kalbach W, et al. Cortical and leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in Alzheimer's disease. *Mol Med.* 2003; 9(3-4):112-122.
142. Ron-Garrido L, Coral-Almeida M, Gabriël S, Benitez-Ortiz W, Saegerman C, Dorny P, et al. Distribution and Potential Indicators of Hospitalized Cases of Neurocysticercosis and Epilepsy in Ecuador from 1996 to 2008. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(11):e0004236.
143. Scarff JE. Treatment of hydrocephalus: an historical and critical review of methods and results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1963; 26(1):1-26.
144. Schmidt MJ, Rummel C, Hauer J, Kolecka M, Ondreka N, McClure V, et al. Increased CSF aquaporin-4, and interleukin-6 levels in dogs with idiopathic communicating internal hydrocephalus and a decrease after ventriculo-peritoneal shunting. *Fluids Barriers CNS.* 2016; 13(1):12.
145. Scitutto E, Fragoso G, Baca M, Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun.* 1995; 63(6):2277-2281.
146. Shaolin Z, Zhanxiang W, Hao X, Feifei Z, Caiquan H, Donghan C et al. Hydrocephalus induced via intraventricular kaolin injection in adult rats. *Folia Neuropathol* 2015; 53:60-68.
147. Shen XQ, Miyajima M, Ogino I, Arai H. Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg.* 2006; 105(6 Suppl):459-464.
148. Silva HM, Vinaud MC, Lino Júnior RS. Experimental neurocysticercosis: absence of IL-4 induces lower encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017; 75(2):96-102.



149. Singh BB, Khatkar MS, Gill JPS, Dhand NK. Estimation of the health and economic burden of neurocysticercosis in India. *Acta Trop.* 2017; 165:161-169.
150. Singh G, Sharma R. Controversies in the treatment of seizures associated with neurocysticercosis. *Epilepsy Behav.* 2017; 76:163-167.
151. Sinha S, Sharma B. Neurocysticercosis: a review of current status and management. *J Clin Neurosci.* 2009; 16:867-876.
152. Skjolding AD, Holst AV, Broholm H, Laursen H, Juhler M. Differences in distribution and regulation of astrocytic aquaporin-4 in human and rat hydrocephalic brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39:179-191.
153. Skjolding AD, Rowland IJ, Sogaard LV, Praetorius J, Penkowa M, Juhler M. Hydrocephalus induces dynamics spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7:20.
154. Sorvillo F, Wilkins P, Shafir S, Eberhard M. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(1):1-6.
155. Sotelo J, Marin C. Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. *J Neurosurg.* 1987; 66(5):686-689.
156. Sotelo J. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011; 11:529-535.
157. Spector R, Snodgrass SR, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol.* 2015; 273:57-68.
158. Suri A, Goel RK, Ahmad FU, Velimana AK, Sharma BS, Mahapatra A. Transventricular, transaqueductal scope-in-scope endoscopic excision of fourth ventricular neurocysticercosis: a series of 13 cases and review. *J Neurosurg Pediatr.* 2012; 1:35-39.
159. Takayanagui OM, Silva AAMCC, Santiago RC, Odashima NS, Terra VC, Takayanagui AMM. Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 1996; 54(4):557-564.
160. Terrazas LI, Bojail R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1998; 84(1):74-81.
161. Thomas WS. Experimental hydrocephalus. *J Exp Med* 1914; 19:106-120.
162. Torres-Corzo JG, Rodriguez-Della Vecchia R, Rangel-Castilla L. Bruns syndrome caused by intraventricular neurocysticercosis treated using flexible endoscopy. *J Neurosurg.* 2006; 104:746-748.
163. Torres-Corzo JG, Tapia-Pérez JH, Vecchia RR, Chalita-Williams JC, Sánchez-Aguilar M, Sánchez-Rodríguez JJ. Endoscopic management of hydrocephalus due to neurocysticercosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010; 112(1):11-16.
164. Tourdias T, Mori N, Dragonu I, Cassagno N, Boiziau C, Aussudre J, Brochet B, Moonen C, Dousset V. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 2011; 8:143.

165. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol.* 2015; 185(8):2259-2268.
166. Villa OF, Kuhn RE. 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(6):561-570.
167. Walin MT, Kurtzke JF. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. *Neurology* 2004; 63(9):1559-1564.
168. Wang D, Nykanen M, Yang N, Winlaw D, North K, Verkman AS, et al. Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46(1):318-324.
169. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966; 30:23-38.
170. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology.* 2010, 17(4):295-306.
171. 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.
172. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology.* 2010; 137:335-46.
173. Wu HW, Ito A, Ai L, Zhou XN, Acosta LP, Lee Willingham A III. Cysticercosis/taeniasis endemicity in Southeast Asia: Current status and control measures. *Acta Trop.* 2017; 165:121-132.
174. Yadav YR, Mukerji G, Parihar V, Sinha M, Pandey S. Complex hydrocephalus (combination of communicating and obstructive type): an important cause of failed endoscopic third ventriculostomy. *BMC Res Notes* 2009; 2:137.
175. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 2006; 31:1116-1128.
176. Zheyne L, Chuzhong L, Xuyi Z, Songbai G, Peng Z, Jiwei B, et al. Ventriculoscopic approach for intraventricular neurocysticercosis: a single neurosurgical center's experience. *World Neurosurg.* 2017; 107:853-859.
177. Zymberg S. Neurocysticercosis. *World Neurosurg.* 2013; 79(2 Supl 2):S24e5-S24e8.

## 9. Epílogo – A Neurocisticercose na Faculdade de Medicina de Botucatu

O estudo da neurocisticercose na Faculdade de Medicina da UNESP – *campus* de Botucatu tem longa trajetória. A professora Svetlana Agapejev, docente aposentada do Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, iniciou os estudos de neurocisticercose no final da década de 1980 e construiu sua trajetória acadêmica com diversas publicações na área. Inicialmente, publicou trabalhos em parceria com colegas da Infectologia versando sobre o uso de albendazol para o tratamento clínico da doença. Posteriormente, estudou alterações do líquido na neurocisticercose, manifestações da doença na faixa etária pediátrica (em conjunto com docentes da Neuropediatria), alterações de exames complementares (como potenciais evocados, tomografia e tomografia por emissão de fóton único) na doença. Também estudou associação da neurocisticercose com outras doenças neurocirúrgicas (como tumores e aneurismas cerebrais) – envolvendo, então, a disciplina de Neurocirurgia nas publicações na área incluindo os professores Armando Alves, Antônio Tadeu de Souza Faleiros e Marco Antônio Zanini. Suas contribuições mais importantes, no entanto, foram publicações a respeito da epidemiologia da neurocisticercose. Seus trabalhos nessa área, baseados em dados de necropsia, imagens radiológicas e positividade sorológica, continuam sendo citados até hoje.

Uma das publicações mais relevantes do grupo estudou a evolução da hidrocefalia em pacientes com neurocisticercose. Esse trabalho envolveu os professores Tadeu Faleiros e Rodrigo Bazan o qual, por sua vez, defendeu mestrado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, sob orientação do professor Osvaldo Massaiti Takayanagui versando sobre a forma racemosa da neurocisticercose e hoje contribui intelectualmente com a linha de pesquisa.

Um dos grandes parceiros acadêmicos da professora Svetlana era o professor Germano Francisco Biondi, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, também no *campus* de Botucatu. O professor Germano desenvolveu diversos trabalhos na área de vigilância epidemiológica e inspeção sanitária animal, tendo rico material de cisticercose suína. Aliás, foi o professor Germano que trouxe cepas de *T. crassiceps* para o Botucatu quando realizou pós-doutorado na Universidade Nacional Autónoma do México. A exemplo da

professora Adelaide José Vaz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, o professor Germano forneceu cepas para diversos centros de pesquisa do Brasil.

Ciente da existência dessas cepas, o professor Marco Zanini sempre teve em mente a realização de trabalhos experimentais com neurocisticercose, na tentativa de reproduzir laboratorialmente essa forma de hidrocefalia que conhecia bem na prática clínica. Foi assim que, em 2013, convidou-me para ingressar na pós-graduação com esse trabalho. Seu apoio e incentivo nos primeiros procedimentos experimentais foram decisivos para o sucesso da empreitada.

O desenvolvimento do modelo experimental ocorreu para a defesa do mestrado e, em decorrência das perguntas que sempre surgem de novos trabalhos, julgamos oportuno manter o modelo como linha de pesquisa para o desenvolvimento de novos projetos. O aprofundamento do estudo do modelo serviu para o doutorado ora defendido.

Porém, antes dos novos procedimentos experimentais, as cepas de *T. crassiceps* foram perdidas por falha no processo de replicação na cavidade peritoneal de camundongos, o que inviabilizaria a linha de pesquisa. Sabendo que outros centros tinham ainda a cepa, o professor Germano gentilmente me acompanhou até a Universidade Federal de Viçosa para pegar cepas cedidas pelo professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto (que também as mantinha desde que o professor Germano as havia cedido pra outros pesquisadores do país).

Reinstituída a manutenção dos parasitas em camundongos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, novos projetos começaram a ocorrer. Alunos de iniciação científica (Marcelo Fogarolli, Marcelo Oliveira, Mônica Silva, Eduardo Barcellos, Miguel Ossuna, Vínicius Oliveira) têm desenvolvido trabalhos na área, com bolsa PIBIC, e novo trabalho de pós-graduação também está sendo conduzido pelo médico residente Aderaldo Alves Júnior.

Finalmente, a mentoria intelectual da professora Agnès Fleury, da Universidade Nacional Autónoma do México (que já tinha publicações com a professora Svetlana e com o professor Germano), tem sido de importância ímpar para a continuação de novos trabalhos – mais arrojados e consistentes.

## 10. Artigo científico em inglês

### **Animal model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus: chronic progressive hydrocephalus with mild impairment of animal status**

Pedro Tadao Hamamoto Filho<sup>1</sup>; Marcelo Ortolani Fogaroli<sup>1</sup>; Marcelo Augusto Chiantelli de Oliveira<sup>1</sup>; Cristiano Claudino Oliveira<sup>2</sup>; Sabrina Setembro Batah<sup>3</sup>; Alexandre Todorovic Fabro<sup>3</sup>; Luiz Carlos Vulcano<sup>4</sup>; Marco Antônio Zanini<sup>1</sup>

1. UNESP – Univ Estadual Paulista. Botucatu Medical School. Department of Neurology, Psychology and Psychiatry
2. UNESP – Univ Estadual Paulista. Botucatu Medical School. Department of Pathology
3. USP – Univ São Paulo. Ribeirão Preto Medical School. Department of Pathology and Legal Medicine
4. UNESP – Univ Estadual Paulista. School of Veterinary Medicine and Animal Science. Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology

#### **Introduction**

Animal models of hydrocephalus are helpful for the understanding of the pathophysiology of the disease and the opening of new therapeutic approaches. The most common experimental model is the kaolin-induced hydrocephalus, which has been used for many years due to its effectiveness and reproducibility (Del Bigio, 1993). However, kaolin injection into the cisterna magna leads to a rapid increase of ventricular size and intracranial pressure, with high rates of peri-procedure deaths and neurological compromise. Even though the mortality rates can be reduced with lower concentrations of the kaolin suspension, the immediate mortality after the injection is not negligible (Lopes et al., 2009).

The injection of low doses of kaolin in immature rats provided an “arrested” pattern of hydrocephalus, in which the ventricular dilatation begins in childhood and progresses very gradually, and correlates with white matter loss and behavior changes (Del Bigio et al. 2003). New animal models have achieved slow progressive hydrocephalus by injecting the kaolin suspension in other sites such as the brain convexity (Li et al., 2008; Nagra et al., 2003; Jusué-Torres et al., 2016) or directly inside the lateral ventricles (Shaolin et al., 2015). These models are able to simulate communicating and normal pressure hydrocephalus.

Neurocysticercosis-induced hydrocephalus is a challenging pattern of

hydrocephalus due to the variability of clinical presentations and pathophysiologic mechanisms involved. Acute hydrocephalus can be observed in patients with sudden obstruction of cerebrospinal fluid flow within the ventricles due to cysts movement, and chronic hydrocephalus can occur in cases of progressive scarring of the basal and convexity arachnoid. Actually, both inflammation and mechanical obstruction are present in patients with neurocysticercosis and hydrocephalus (Colli et al., 2002; Sotelo, 2011). These features pose some difficulties for the surgical management of hydrocephalus in neurocysticercosis (Colli et al., 2002; Agapejev et al., 2007), despite the advances gained with endoscopic approaches (Torres-Corzo et al., 2010; Zhenye et al., 2017). Therefore, it is important to develop animal models for the study of hydrocephalus in neurocysticercosis.

Ventricular dilatation has been observed in some animal models of neurocysticercosis (Mato-Silva et al., 2012; Moura et al., 2016) and, recently, a model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus was proposed by injecting cysts of *Taenia crassiceps* (an analogue cestode of *T. solium*) into the cisterna magna of rats (Hamamoto Filho et al., 2017). This model showed similar radiological and morphological features of human extraparenchymal neurocysticercosis, including hydrocephalus.

In this work, we aimed to study the long-term evolution of the rat model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus in terms of animal weight gain, behavioral alterations, magnetic resonance imaging features, and morphological alterations, with focus on aquaporin-4 expression.

## **Methods**

52 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 100-200g were used. They were handled according to ethical principles for animal welfare and the board of the local Ethics Committee on Animal Use approved the study project. The animals were kept under adequate sanitary conditions, with food and water available ad libitum, with light/dark cycles of 12h, in a room with temperature control (21°). The sample size was calculated considering a 30% mortality after the procedures, and the possibility of reaching statistical differences in terms of ventricular volume with 5 animals in each group according to a pilot study (Hamamoto Filho et al., 2016).

### ***Experimental design***

The animals were divided into four groups. The first group (n = 16) received the inoculation of 50 cysts of *T. crassiceps* (50 cysts/animal) into the cisterna magna (cyst

group). The second one (n = 15) received the injection of 0.02ml of an antigenic suspension of cysts of *T. crassiceps* into the cisterna magna (antigen group). In the third one (n = 13), the animals were injected with 0.02ml of a 25% kaolin suspension (kaolin group). And the fourth group (control) received the injection of 0.02ml of 0.9% saline (n = 8).

By the end of the first month of observation, the animals underwent an open field test (OFT) for behavior assessment and a magnetic resonance imaging (MRI). Half of the animals from the cyst, antigen, and control groups were euthanized (using a systematic sampling), as well as all the animals from the kaolin group. The animals of the kaolin group were not kept alive for more than one month due to ethical consideration of animal suffering. The other animals were kept for more five months, and then underwent a new OFT and MRI scanning. Finally, they were euthanized. The animals were weighed immediately before the euthanasia and the encephala were removed just after the euthanasia for histologic and immunohistochemical assessment.

### ***Parasites and inoculations***

Cysts from *T. crassiceps* kept in subsequent inoculations in the peritoneal cavity of mice (*Mus musculus*) (Willms and Zurabian, 2010) were aseptically removed and selected according to the size and viability for inoculation into the cisterna magna of rats from the cyst group (50 cysts/rat).

For the antigenic suspension the remaining cysts were kept in saline with protease inhibitor (SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA Free – Sigma-Aldrich) at -2°C. Then, they were sonicated with two cycles of 1 minute at 10°C and 60% amplitude. The resulting suspension was centrifuged at 0°C and 180Hz for 1 minute. The supernatant was used and its protein concentration was determined by the Bradford method, reaching 2.86mg/ml. Each animal of the antigen group received 0.02 ml of this suspension through a cisternal injection.

The kaolin group received 0.02ml of 25% kaolin suspension and the control group received 0.02ml of 0.9% saline. For the experimental procedures, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 0.1ml/kg moisture of ketamin (100mg/ml) and xylazine (20mg/ml). The inoculations were done after a 1cm skin incision in the occipito-cervical transition, using a 25G needle. The skin was then closed with 4.0 mononylon.

### ***Open field test***

The animals' behavior was assessed using the open field test (OFT), according to Olopade et al., 2012. Briefly, it was used a 72x72cm box with lines splitting the floor into 16 squares of 18x18cm. Each rat was maintained in the box during 5 minutes and the movements were recorded using a GoPro Hero 3+ digital camera (GoPro Inc, USA). The records were assessed by an independent observer registering the horizontal moves (number of crossed lines), vertical moves (number of times in hind limbs support), center time (duration in the central squares) and number of evacuations.

### ***Magnetic resonance imaging***

For the MRI exam, the animals were anesthetized with 0.5ml/kg of a mixture of ketamin (100mg/ml) and xilazina (20mg/ml). MRI was performed using a 0.25 T equipment (Esaote, model Vet-MR). The slices were set at 0.6mm thick in a T2 echo-gradient acquisition (echo time: 5ms, and repetition time: 10ms). The images were analyzed concerning the distribution of cysts in the ventricles and in the subarachnoid space. For ventricular volume quantification, a volumetric study was done using the software ITK-SNAP v 3.0.0 (Yushkevich et al., 2006). The cut-off value for considering the presence of hydrocephalus was set at 5mm<sup>3</sup> (Harris et al., 1992).

### ***Histologic assessment***

After the animals were euthanized, we performed a cardiac perfusion with saline followed by buffered formalin 10% for brain fixation. Then, the encephala were removed and cut in the coronal plane at the level of the optic chiasm. The slices were kept in buffered formalin for 12 hours at room temperature followed by sequential dehydration in increasing concentrations of alcohol, diafanized in xylene and embedded in paraffin. The blocks were cut into 5µm sections for hematoxylin-eosin staining and into 3µm for immunohistochemical staining.

For immunohistochemistry, the slices were dewaxed in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of alcohol until water. For antigenic recovery, the slides were heated in pressure cooker at 98°C with citrate buffer, pH 6.0 for 30 minutes. The slides were incubated in 0.3% hydrogen peroxide at room temperature for endogenous tissue peroxidase block. Then, they were washed with Tris buffered saline + Tween 20, pH 7.5 (TBST). The primary antibodies anti-aquaporin-4 and anti-GFAP were incubated for 1 hour in humid camera at room temperature. A new wash was done with TBST, and the secondary antibody was applied using peroxidase horseradish polymer conjugated during 30 minutes at room temperature. After a new TBST wash, 3,3' diaminobenzidine



(DAB) was applied for 5 minutes for stain. A counter-staining with HE was then performed.

Morphological assessment was done considering periventricular astrogliosis and inflammation, choroid plexus edema and inflammation, and positivity of aquaporin-4 and GFAP. Stereologic point counting procedures were applied to perform a morphometric analysis (Weibel et al., 1966).

### ***Statistical analysis***

The non-parametric test of Kruskal-Wallis followed by the Dunn test was used for comparisons among multiple groups. Mann-Whitney test was used for comparison between independent groups and the Wilcoxon test for paired data. T student test and ANOVA were used for normal distribution variables. Correlation between variables was calculated using the Spearman test. Differences were considered significant with  $p < 0.05$ . The statistical analyses were performed using SPSS (v. 21.0), R (v. 2.11.0) and GraphPad (v 5.0) softwares.

### **Results**

The peri-procedure mortality of the animals was of 23%: one animal from the cyst group (1/16); three from the antigen group (3/15); six from the kaolin group (6/13) and two from the control group (2/8). During the first month of observation one animal from the antigen group and another from the control group died. Therefore, 38 animals completed one month of observation: 15 from the cyst group, 11 from the antigen group, from the kaolin group, and 5 from the control group. After the first month, all animals from the kaolin group were euthanized, as well as 7 from the cyst group, 6 from the antigen group and 3 from the control group. The remaining animals would fulfill six months observation, but one more animal from the cyst group died. Finally, one animal from the cyst group and one animal from the antigen group died just after the second MRI and did not perform the second OFT.

### ***Weight gain***

There was no difference on initial weight among the animal groups. After the first month, mean weight was of 305.6g in the cyst group, 308.2g in the antigen group, 239.9 in the kaolin group, and 307.7 in the control group. The kaolin group had a statistically significant lower mean weight than the other groups ( $p = 0.039$ ). By the end of the sixth month, the mean weight was of 434.7g in the cyst group, 567.0g in the antigen group, and 530.0g in the control group. This time, the cyst group had a

statistically significant lower weight than the other groups ( $p = 0.029$ ), as shown in graph 1.

### ***Behavioral assessment***

By the end of the first month, we found no difference between the groups in terms of vertical moves, center time and number of evacuations. However, we found a difference in terms of horizontal moves (number of crossed lines): the kaolin group had an inferior performance comparing to the cyst and antigen groups (16.1, 38.9, and 49.0, respectively,  $p = 0.023$ ). By the end of the sixth month, the animals from the cyst group spent more time in the center of the field than the animals from the antigen and control groups (127.4, 12.3, and 8.5 seconds, respectively) but this difference did not reach statistical difference ( $p > 0.05$ ).

### ***Radiological assessment***

After the first month post-inoculation, the mean ventricle volume was of  $1.1\text{mm}^3$  in the control group,  $2.2\text{mm}^3$  in the antigen,  $59.0\text{mm}^3$  in the cyst group, group, and  $112.8\text{mm}^3$  in the kaolin group (figure 1). Using multiple comparison tests, the cyst and kaolin group had larger ventricle volumes than the antigen and control groups ( $p = 0.0003$ ). In the control group, no animal developed hydrocephalus; in the antigen group, one animal had hydrocephalus (1/11); in the cyst group, 9 animals (9/15); and in the kaolin group, 4 animals (4/7).

After six months, the mean ventricle volume was of  $1.15\text{mm}^3$  in the control group,  $3.57\text{mm}^3$  in the antigen group, and  $568.9\text{mm}^3$  in the cyst group (figure 2). This time, statistical differences were not found due to the large variability of ventricle volumes in the cyst group (standard deviation =  $515.9\text{mm}^3$ ). However, when comparing the final volume with the 1-month volume in the cyst group, a significant difference was found ( $p = 0.03$ ) – table 1. At this time, no animal in the control group had hydrocephalus, but one animal in the antigen group (1/6) and four animals in the cyst group did (4/6).

Regarding the distribution of cysts in the cyst group, by the end of the first month, ten animals (10/15) presented cysts in the basal cisterns of the brain or in the cisterna magna or in the subarachnoid space of the cervical spine. From these 10 animals, 9 had hydrocephalus; and from the non-hydrocephalic animals (6/15), only one had a detectable cyst. At the end of the sixth month, considering the 6 surviving animals, all the 4 hydrocephalic rats had detectable cysts in the basal and magna cisterns, as well as in the convexity subarachnoid space. Three of them had intraventricular cysts, and

one animal, in the cervical spine (figure 3).

### ***Histologic assessment***

The cyst, antigen and kaolin groups presented morphological changes in the periventricular, periependyma and choroid plexus regions. In the periventricular region, it was observed reactive astrogliosis and lymphocytic inflammatory cells. In the periependyma region, it was observed the same predominance of lymphocytes inflammation. The choroid plexus had edema and also lymphocytic inflammatory pattern (figure 4). Using stereological approaches to quantify the morphologic changes we observed that the presence of inflammation was more intense in the cyst group than in the control and kaolin groups ( $p < 0.05$ ) (graph 2A); the edema and inflammation in the choroid plexus was similar in the cyst and kaolin groups and superior than the antigen and control groups (graph 2B). Inflammation in the supependyma area occurred only in the cyst and antigen group.

The immunostaining of GFAP and AQP-4 was similar to the periventricular astrogliosis, occurring in the cyst, antigen and kaolin groups (figure 5). However, the analysis considering the animals euthanized at the first month and at the sixth month post-inoculation, showed a decrease in the expression of periventricular GFAP in the cyst and antigen group in the sixth month, and an increase in the expression of periventricular AQP-4 (graph 2 C and D).

### ***Correlation of parameters***

Correlations between data from weight, behavioral changes, ventricular volume and histologic changes were tested, and were found to be significant for weight and ventricular month at the sixth month ( $R = - 0.642$ ,  $p = 0.02$ ).

## **Discussion**

Acute hydrocephalus commonly presents with signs of raised intracranial pressure with high risk of death or serious neurological damage. Conversely, chronic hydrocephalus presents with progressive impairment of motor and cognitive functions and may be similar to dementia syndromes. Actually, several studies have called attention to a possible linkage between CSF imbalance, hydrocephalus and neurodegenerative conditions such as Alzheimer's disease. (Jessen et al., 2015; Silverberg et al., 2015; Plog and Nedergaard, 2018).

Hydrocephalus in neurocysticercosis has a variable pattern of presentation,

including acute, subacute and chronic forms. This variability is related to the different pathophysiologic mechanisms underlying CSF imbalance, including inflammation in the CSF compartments, fibrotic scars in the basal cisterns, mechanical obstruction in the narrower points of the ventricular system, and damage to the arachnoid villi (Sotelo, 2011; Fleury et al., 2015). Therefore, experimental models of neurocysticercosis are helpful to better understand the pathophysiologic mechanisms and test new therapeutic approaches (Nash et al., 2006; Arora et al., 2017).

Initial observations of the model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus showed that the animals did not have ventricle enlargement without early deterioration of clinical condition (Hamamoto Filho et al., 2016) and, then, opened the perspectives for the study of longstanding hydrocephalus, mimicking chronic hydrocephalus. In this study, the long-term assessment of this experimental model confirmed a progressive evolution of hydrocephalus with less severe illness of the animals. Actually, in the first month post-inoculation, the animals from the cyst group had ventricle volumes comparable to animals from kaolin group, but had body weight similar to the animals from the control group. The difference of weight in the cyst group was detected in the sixth month post-inoculation. Difficulty in weight gain is an early sign of chronic hydrocephalus and may be related to injuries to the hypothalamic center of appetite, as a consequence of the third ventricle stretch (Del Bigio et al., 2003).

Consistently, in the behavior assessment, the cyst group had a better performance in terms of horizontal moves than the kaolin group in the first month; and in the sixth month, the cyst group tended to be less active than the control and antigen groups (in which the animals did not have hydrocephalus). However, caution is needed to exploit these findings because in another important parameter (vertical moves – the number of times the animals supported in the hind legs), there was no statistical difference. Previous studies of experimental hydrocephalus with kaolin have shown that the animals have reduction in the exploratory activity that is worsened by motor dysfunctions (Olopade et al., 2012; Garcia et al., 2017). Additionally, it is frequent to find no correlation between the degree of hydrocephalus and behavior impairment, as well as discrepancy between tests parameters (Del Bigio et al., 1997). These conflicting data may be due to anxiety related neurotransmitters that may lead to increased curiosity, and then, more exploratory activity or to fear and less activity (Griebel et al., 1993; Hwang et al., 2011).

In terms of MRI findings, we observed that most of the hydrocephalic animals did not have detectable cysts and, then, the presence of cysts was necessary to the occurrence of hydrocephalus indicating that the mechanical obstruction is the main

mechanism responsible for hydrocephalus, even though inflammation is present, as observed in histologic assessment. Actually, the cysts grow slowly in the subarachnoid space, mimicking what happens in the racemose degeneration of *T. solium* (Escobar, 1983), therefore, the obstruction to CSF flow is gradual. The antigen inoculation was not able to successfully induce hydrocephalus. A possible explanation may be the low protein concentration (2.86mg/ml) used, especially if compared with the standard dose of kaolin (250mg/ml).

Regarding the distribution of cysts, it is of particular interest to observe cysts inside the ventricles and throughout the subarachnoid space, even though they were injected solely in the cisterna magna. In fact, the cysts moved through the CSF compartments, in a similar pattern of the human's disease (García and Del Brutto, 2003; Figueroa et al., 2011).

The morphological changes showed that inflammatory reactions occur with the inoculation of cysts, antigens, and kaolin. However, the higher rate of inflammation in the cyst group may point to a sustained interaction of the host with the living parasite. The predominance of lymphocytes was expected because of the chronic nature of the inflammation, yet we cannot disconsider a possible initial polymorph nuclear influx, as demonstrated in other models of intracranial infection with *T. crassiceps* (Matos-Silva et al., 2012; Moura et al., 2016).

The choroid plexus was similarly edematous and infiltrated with lymphocytes in the cyst and kaolin groups – the groups with hydrocephalus. It is possible that the edema of the plexus choroid may be related to a downregulation of aquaporin-1, a water channel molecule that participates in the CSF production (Wang et al., 2011). In other model of neurocysticercosis, the choroid plexus maintained the integrity of junctional complex proteins, beavering as a less important site for leucocyte influx than the ependyma and the blood brain barrier (Alvarez et al., 2010). Therefore, the findings in the choroid plexus in our model may be more related to the hydrocephalus itself than with the neurocysticercosis.

GFAP and AQP-4 are generally colocalized in experimental models of brain edema (Tourdias et al., 2009). In a study of normal pressure hydrocephalus in humans, Eide and Hansson observed an increase in astrogliosis and a reduction of AQP-4 expression in human brain cortex (Eide and Hansson, 2018). However, we found that in the cyst group, the animals euthanized after 1 month had fewer AQP-4 and higher GFAP periventricular expression than the animals euthanized in 6 months. To note, a similar pattern was observed in the antigen group. Therefore, one could argue whether the inflammation against *T. crassiceps* may modulate differently the expression of AQP-4,

allowing for a chronic pattern of partially compensate hydrocephalus.

AQP-4 is a well-established water channel molecule upregulated in hydrocephalus as a compensatory mechanism for water absorption from the brain parenchyma to the vessels (Filippidis et al., 2011). It is localized in the astrocytes' vascular endfeet, in the Virchow-Robin space – where several changes between the interstice and the CSF occur, configuring the recently called glymphatic system (Jessen et al., 2015). Disorders in the glymphatic system have been identified in the development of Alzheimer's disease, cognitive impairment after traumatic brain lesion and, in normal pressure hydrocephalus (Ringstad et al., 2017). These findings are coherent with the identification of kaolin deposition in the Virchow-Robin space in a recent experimental model of chronic hydrocephalus (Jusué-Torres et al., 2016).

This experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus allowed for the maintenance of the hydrocephalic animals for a long time with mild impairment of their clinical performance in terms of body weight and behavior changes. The progressive evolution of ventricle dilatation may be a determinant factor, but the role of AQP-4 as a compensatory mechanism for water clearance is suggested, and deserves more investigations.

## References

1. Agapejev S, Pouza AF, Bazan R, Faleiros ATS. Clinical and evolutive aspects of hydrocephalus in neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65:674-80.
2. Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 2010; 137(3):359-372.
3. Arora N, Tripathi S, Kumar P, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol.* 2017; 39(7):e12439.
4. Colli BO, Carlotti Jr CG, Assirati Jr JA, Machado HR, Valença M, Amato MC. Surgical treatment of cerebral cysticercosis: long-term results and prognostic factors. *Neurosurg Focus* 2002; 12(6):e3.
5. Del Bigio MR, Crook CR, Buist R. Magnetic resonance imaging and behavioral analysis of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus: pre- and postshunting observations. *Exp Neurol* 1997;148(1):256–264.
6. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol.* 2003; 53:337-46.

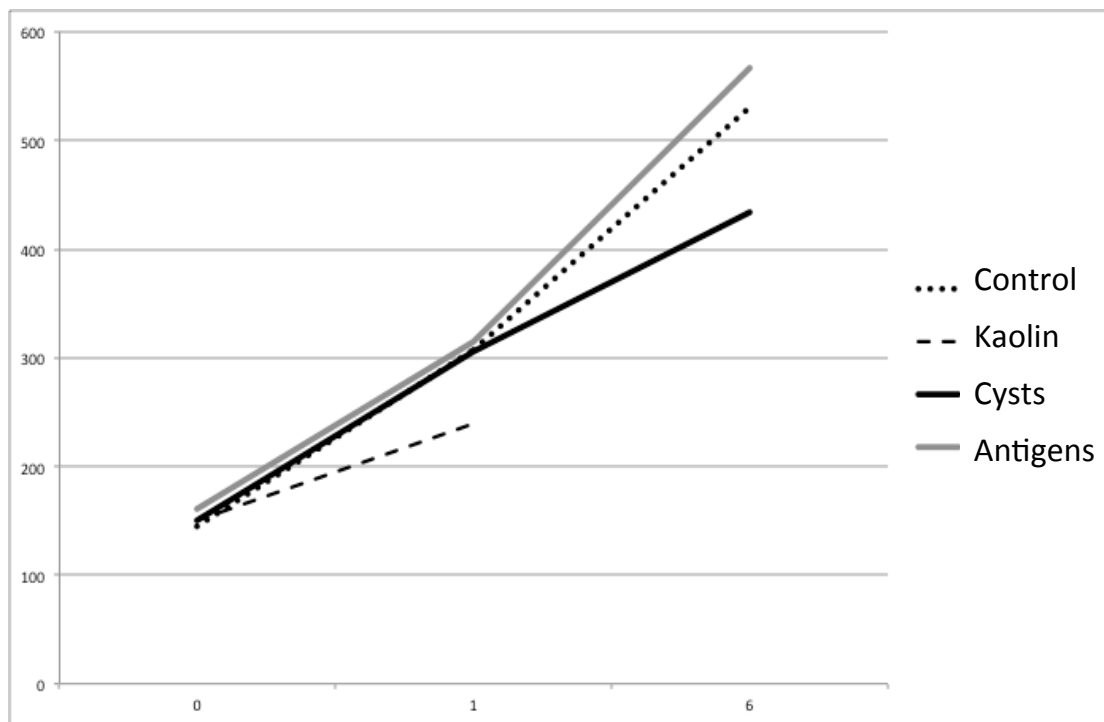
7. Del Bigio MR. Neuropathological changes caused by hydrocephalus. *Acta Neuropathol.* 1993; 85:573-85.
8. Eide PK, Hansson HA. Astrogliosis and impaired aquaporin-4 and dystrophin systems in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018; 44(5):474-490.
9. Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. in: Palacios E, Rodriguez-Carbajal J, Taveras JM (Eds.) *Cysticercosis of the central nervous system.* Charles C Thomas, Springfield; 1983: 27-54.
10. Figueroa JJ, Davis LE, Magalhaes A. Extraparenchymal neurocysticercosis in Albuquerque, New Mexico. *J Neuroimaging.* 2011; 21(1):38-43.
11. Filippidis AS, Kalani MY, ReKate HL. Hydrocephalus and aquaporin: lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst.* 2011; 27(1):27-33.
12. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciotto 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.
13. Garcia CAB, Catalão CHR, Machado HR, Júnior IM, Romeiro TH, Peixoto-Santos JE, et al. Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Childs Nerv Syst.* 2017; 33(3):419-428.
14. García HH, Del Brutto OH. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2003; 87(1):71-78.
15. Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol.* 1993; 4(6):637-644.
16. Hamamoto Filho PT, Fabro AT, Rodrigues MV, Bazan R, Vulcano LC, Biondi GF, Zanini MA. *Taenia crassiceps* injection into the subarachnoid space of rats simulates radiological and morphological features of racemose neurocysticercosis. *Childs Nerv Syst.* 2017; 33:119-23.
17. Harris NG, Jones HC, Williams CR. MR imaging for measurements of ventricles and cerebral cortex in postnatal rats (H-Tx strain) with progressive inherited hydrocephalus. *Exp Neurol* 1992; 118(1):1-6.
18. Hwang YS, Shim I, Chang JW. Anxiety responses and neurochemical changes in kaolin-induced rat model of hydrocephalus. *J Neurosurg Pediatr.* 2011; 7(4):401-407.
19. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M. The glymphatic system: a beginner's guide. *Neurochem Res.* 2015; 40(12):2583-2599.
20. Jusué-Torres I, Jeon LH, Sankey EW, Lu J, Vivas-Buitrago T, Crawford JA, Pletnikov MV, Xu J, Blitz A, Herzka DA, Crain B, Hulbert A, Guerrero-Cazares H, Gonzalez-Perez O, McAllister JP, Quiñones-Hinojosa A, Rigamonti D. A Novel Experimental Animal Model of Adult Chronic Hydrocephalus. *Neurosurgery.* 2016; 79:746-56.

21. Li J, McAllister JP, Shen Y, Wagshul ME, Miller JM, Egnor MR, Johnston MG, Haacke EM, Walker ML. Communicating hydro- cephalus in adult rats with kaolin obstruction of the basal cis- terns or the cortical subarachnoid space. *Exp Neurol.* 2008; 211: 351-61.
22. Lopes LS, Slobodian I, Del Bigio MR. Characterization of juvenile and young adult mice following the induction of hydrocephalus. *Exp Neurol.* 219:187-96.
23. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VBL, Vinaud MC, Oliveira MAP, Lino-Júnior RS. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012; 70:287-92.
24. Moura VBL, Lima SB, Matos-Silva H, Vinaud MC, Loyola PR, Lino RS. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology.* 2016; 143:334-42.
25. Nagra G, Wagshul ME, Rashid S, Li J, McAllister JP, Johnston M. Elevated CSF outflow resistance associated with impaired lymphatic CSF absorption in a rat model of kaolin-induced communicating hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7:4.
26. Nash TE, Singh G, White AC, Rajshekhar V, Loeb JA, Proaño JV, et al. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology* 2006; 67(7):1120-1127.
27. Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén AL. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids Barriers CNS* 2012;9:19.
28. Plog BA, Nedergaard M. The glymphatic system in CNS health and disease: past, present and future. *Annu Rev Pathol.* 2018; 13:379-394.
29. Ringstad G, Vatnehol SAS, Eide PK. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain.* 2017; 140(10)2691-2705.
30. Shaolin Z, Zhanxiang W, Hao X, Feifei Z, Caiquan H, Donghan C, Jianfeng B, Feng L, Shanghang S. Hydrocephalus induced via intraventricular kaolin injection in adult rats. *Folia Neuropathol.* 2015; 53:60-8.
31. Silverberg GD, Miller MC, Pascale CL, Caralopoulos IN, Agca Y, Agca C, Stopa EG. Kaolin-induced chronic hydrocephalus accelerates amyloid deposition and vascular disease in transgenic rats expressing high levels of human APP. *Fluids Barriers CNS.* 2015; 20:2.
32. Sotelo J. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11:529-35.
33. Torres-Corzo JG, Tapia-Pérez JH, Vecchia RR, Chalita-Williams JC, Sánchez-Aguilar M, Sánchez-Rodríguez JJ. Endoscopic management of hydrocephalus due to neurocysticercosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010; 112:11-6.
34. Wang D, Nykanen M, Yang N, Winlaw D, North K, Verkman AS, et al. Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46(1):318-324.
35. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966; 30:23-38.



36. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. 2010; 137:335-46.
37. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 2006; 31:1116-1128.
38. Zhenye L, Chuzhong L, Xuyi Z, Songbai G, Peng Z, Jiwei B, Lei C, Xinsheng W. Ventriculoscopic approach for intraventricular neurocysticercosis: a single surgical center's experience. *World Neurosurg*. 2017; 107:853-9.

## Figures



Graph 1. Variation of the weight of the animals over the observation period, according to the groups. At the initial time, the weight of the animals was similar between the groups. At the end of the first month, the kaolin group presented a mean weight significantly lower than the other groups ( $p = 0.039$ ). At the end of the sixth month, the cysts group had significantly lower mean weight than the control group and antigens ( $p = 0.029$ ).

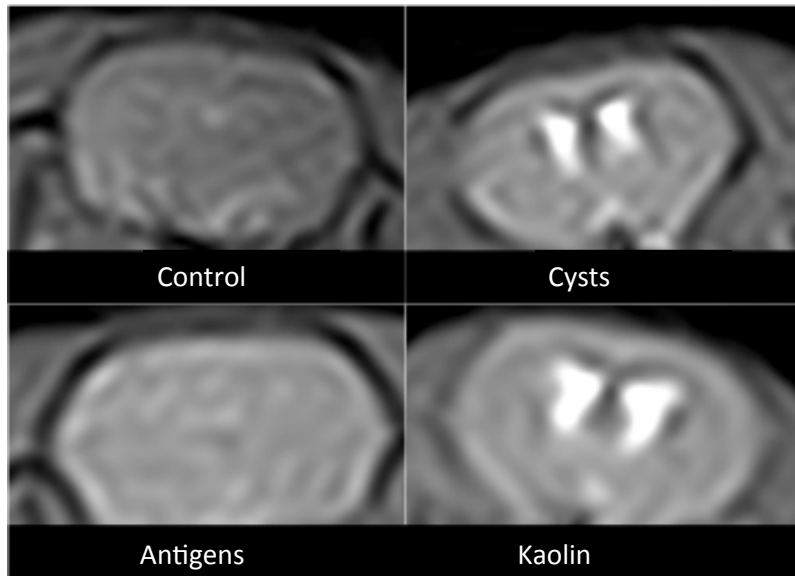


Figure 1. Magnetic resonance imaging of the ventricular dilation pattern of the experimental groups in the first month after inoculation. The control and antigen groups did not present dilated ventricles, unlike cysts and kaolin groups.

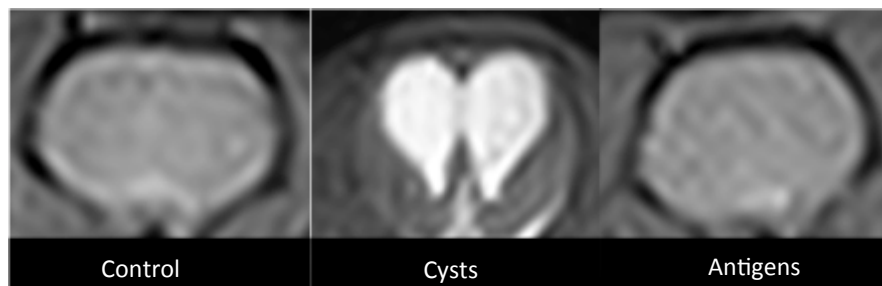


Figure 2. Magnetic resonance imaging of the ventricular dilation pattern of experimental animals kept alive until the sixth month after inoculation. Control groups and antigens did not present dilated ventricles, unlike cysts.

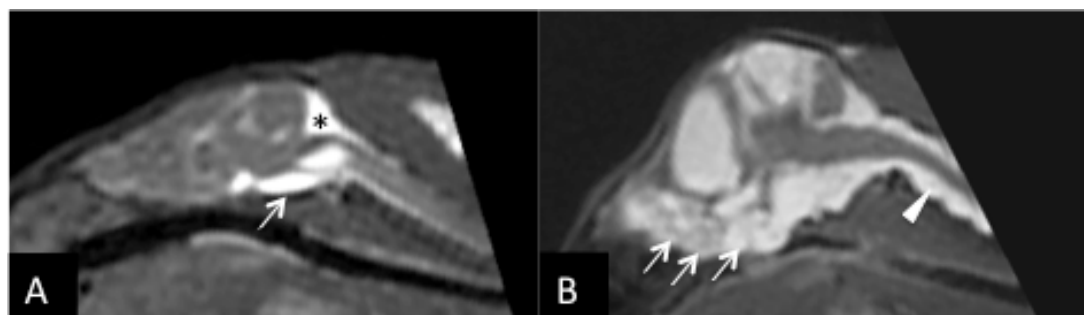


Figure 3. Magnetic resonance imaging of animals from the cysts group showing the pattern of cysts distribution in the cerebrospinal fluid spaces. A: RM 1 month after inoculation, B: RM 6 months after inoculation. Arrow: cysts in the cisterns of the base. Arrow tip: cysts in the subarachnoid space of the cervical spine. \* cysts in the cistern magna.

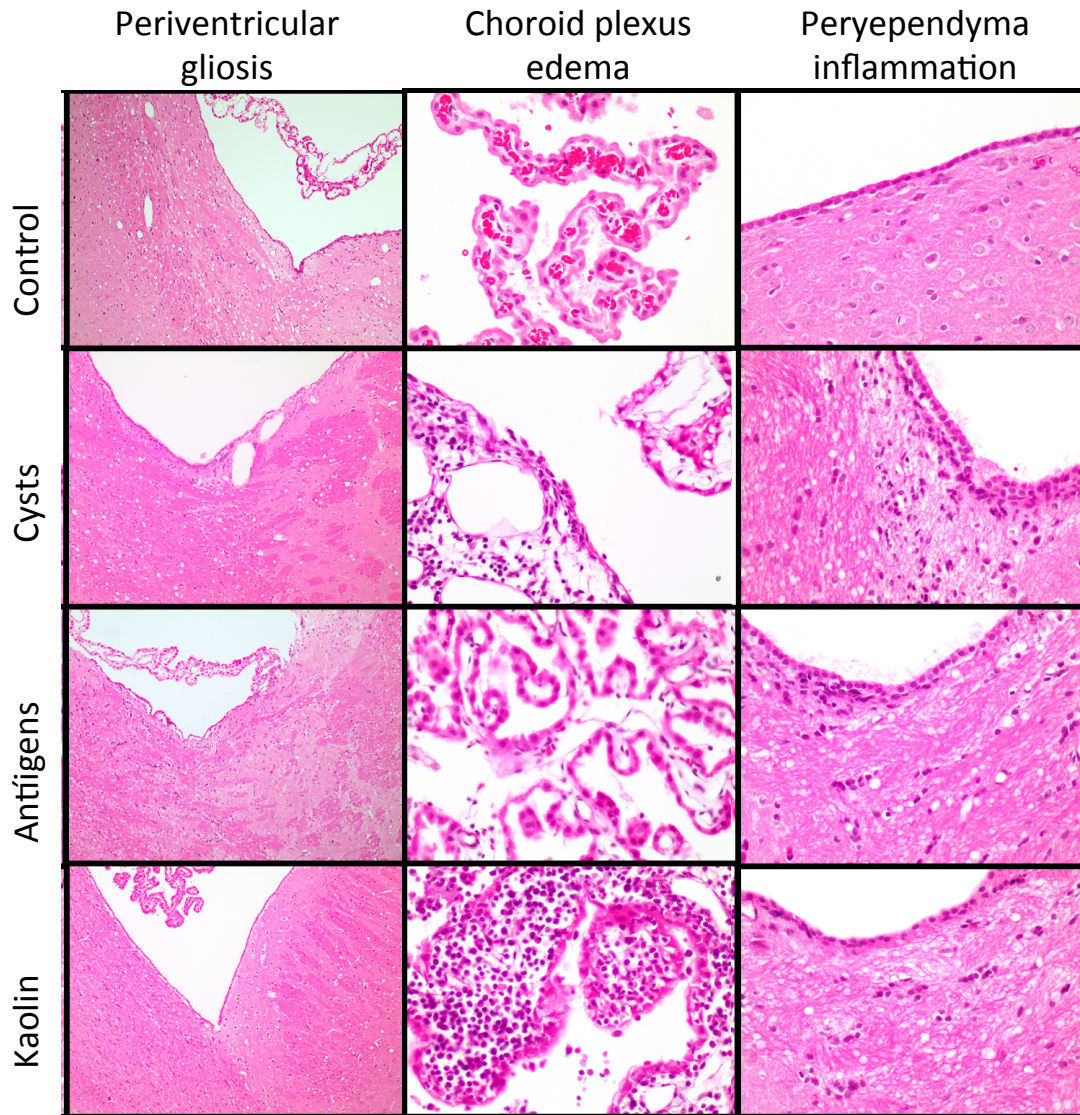


Figure 4. Panel of histological changes in the experimental groups shows reactive astroglial changes in the cysts, antigens and kaolin groups. Choroid plexus edema and lymphocytic inflammatory infiltrate are observed mainly in the cysts and kaolin groups. Already peri-ependyma inflammatory infiltrate occurs more clearly in the cysts and antigen groups.

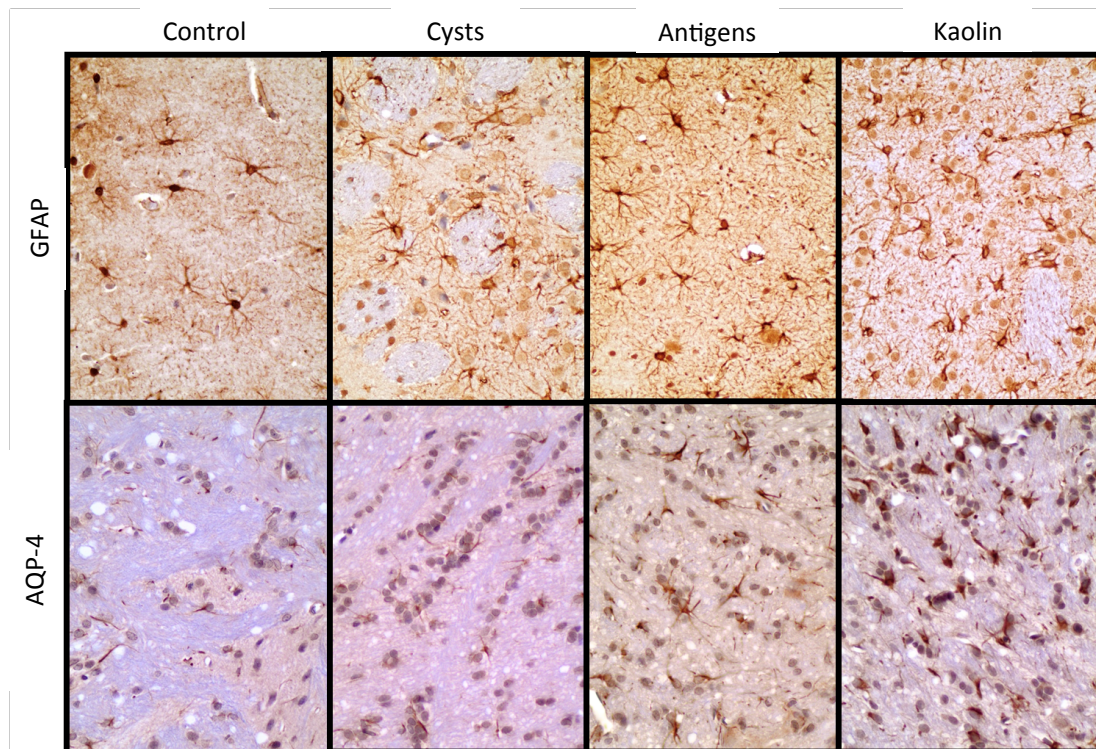
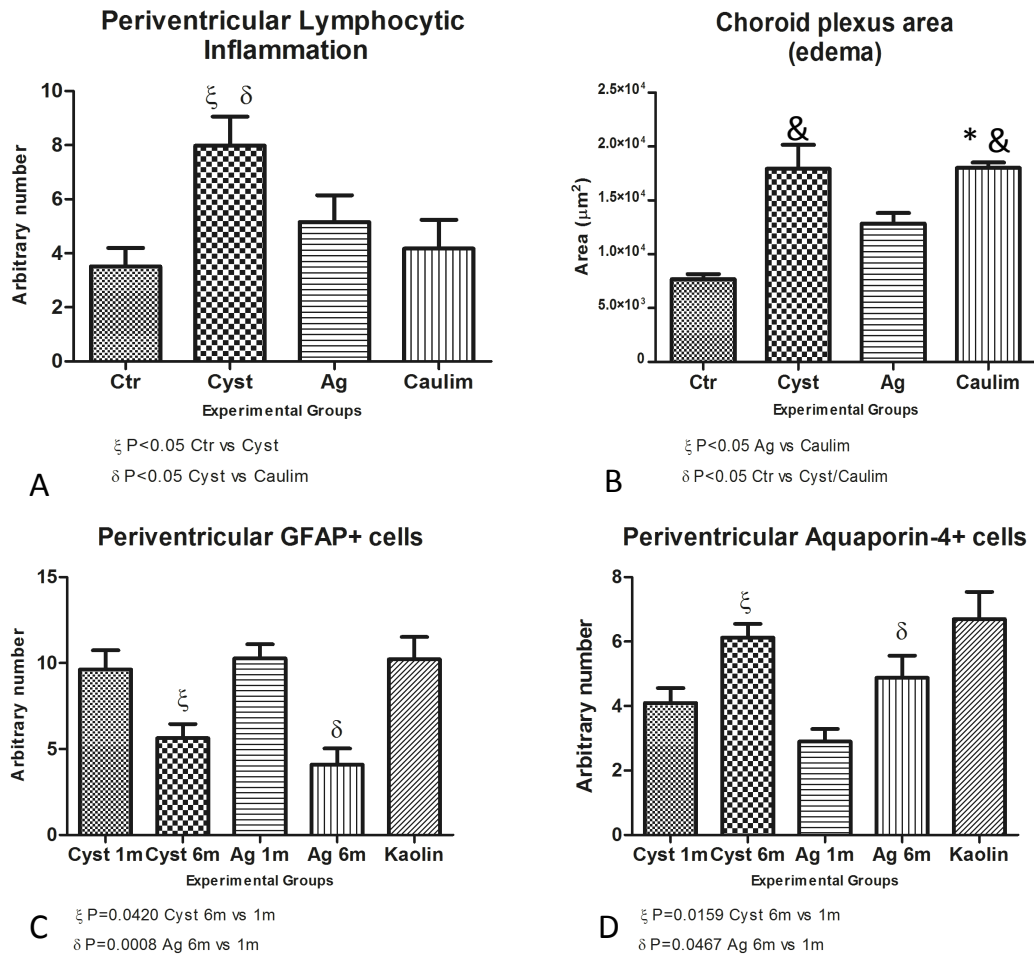


Figure 5. Immunohistochemical panel of GFAP and AQP-4. The expression of the markers is more intense in the cysts, antigens and kaolin groups than in the control group.



Graph 2. A: Quantification of periventricular lymphocytic inflammatory infiltrate according to the Weibel reticulum count. The animals of the cysts and antigen groups presented greater inflammatory infiltrate than the control and kaolin groups, with statistical difference for the cysts group alterations in comparison to the control and kaolin groups. B: Area of edema of the choroid plexus measured by the area of the choroid plexus. The cysts and kaolin group had more choroid plexus edema. C: Quantification of GFAP + cells in the periventricular region, according to the Weibel reticulum count. The 6-month observation subgroups had lower GFAP immunoreactivity than their 1-month observation subgroups. D: Quantification of AQP-4 + cells in the periventricular region, according to the Weibel reticulum count. The 6-month observation subgroups showed higher AQP-4 immunoreactivity than their 1-month observation subgroups.

## 11. Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa no CEUA

		
	Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012	
<h1>CERTIFICADO Nº 1148/2015-CEUA</h1>		
<p>Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1148-2015) Estudo das alterações comportamentais radiológicas e morfológicas da hidrocefalia induzida por neurocisticercose experimental, a ser conduzido por Pedro Tadao Hamamoto Filho, orientado pelo Prof. Dr. Marco Antônio Zanini, com a colaboração de Alexandre Todorovic Fabro, Diego Generoso, Germano Francisco Biondi e Luiz Carlos Vulcano, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.</p>		
<b>Vigência do projeto</b>	30/09/2016	
<b>Espécie/Linhagem</b>	Rato Novergicus	
<b>Nº de animais</b>	48	
<b>Peso/Idade</b>	150 a 200 gramas/6 a 7 semanas	
<b>Sexo</b>	Macho	
<b>Origem</b>	Biotério Central da FMB-UNESP	
<b>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 27/08/2015</b>		
 Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros Presidente da CEUA	 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br		