



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

Diego Generoso

**Estresse oxidativo no modelo experimental de
neurocisticercose extraparenquimatosa**

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zanini

**Botucatu
2024**

Diego Generoso

Estresse oxidativo no modelo experimental de
neurocisticercose extraparenquimatosa

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zanini

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Generoso, Diego.

Estresse oxidativo no modelo experimental de neurocisticercose
extraparenquimatosa / Diego Generoso. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Marco Antonio Zanini

Capes: 40102084

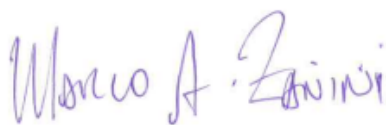
1. Cisticercose. 2. Estresse oxidativo. 3. Neurocisticercose.
4. Taenia.

Palavras-chave: Cisticercose; Estresse oxidativo;
Neurocisticercose; *Taenia crassiceps*.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DIEGO GENEROSO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E MEDICINA TRANSLACIONAL, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 06 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 08:15 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de DIEGO GENEROSO, intitulada **Estresse oxidativo no modelo experimental de neurocisticercose extraparenquimatosa**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZANINI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Neurociências e Saúde Mental / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. MANUELLA PACIFICO DE FREITAS SEGREDU (Participação Presencial) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. RODRIGO MATTOS DOS SANTOS (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Doenças Tropicais - UNIPEX / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ADERALDO COSTA ALVES JUNIOR (Participação Virtual) do(a) Northern Ontario School of Medicine, NOSM, Canadá, Prof. Dr. THIAGO DIAS FERNANDES (Participação Virtual) do(a) Unidade de Especialidades Clínicas / HU/Campo Grande - UFMS. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZANINI



Agradecimentos

À minha família: meus pais, José Márcio e Marlene, por todo o amor, meu irmão César, minha esposa Cinthia e meus filhos, Amanda e Vinicius pelo carinho, amor e estímulo para meu crescimento.

Aos professores, Pedro Tadao Hamamoto Filho pelos ensinamentos, confiança e incentivador para crescer profissionalmente e Marco Antônio Zanini pelo apoio e confiança na minha capacidade em realizar esse projeto.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental que ajudaram em diversos momentos do trabalho: José Antônio Germiniano, Luiz Carlos Bardella, Denise Perone, Robson dos Anjos Ferreira, Rosangela de Campos, Luiz Carlos July, Marcos Rogério Pimentel, à Profa. Camila Renata Correa Camacho e a aluna Jordana Cruzeiro do laboratório de estresse oxidativo. Por fim, mas não menos importante, a aluna Tatiane Camargo que me auxiliou em todas as etapas do projeto.

Resumo

A neurocisticercose (NCC) é causada pela presença larval de *Taenia solium* (*T. solium*), os cisticercos, no encéfalo de seres humanos que ingeriram ovos do parasita. A forma extraparenquimatosa da NCC tem um curso mais agressivo, pois os cistos localizados nos compartimentos do líquido cefalorraquidiano podem desencadear uma intensa reação inflamatória. Para estudar o estresse oxidativo, utilizamos um modelo experimental de NCC extraparenquimatosa em ratos. Os animais foram divididos em quatro grupos: 20 machos infectados, 20 fêmeas infectadas, 5 machos controle e 5 fêmeas controle. A inoculação foi realizada nos grupos infectados por meio da punção do espaço subaracnóideo da cisterna magna na transição occípito-cervical e injeção de 50 cistos viáveis de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*). Após três meses da inoculação, todos os animais foram eutanasiados. O cérebro foi coletado e seccionado em dois hemisférios. Um hemisfério foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em um freezer a -80°C para a avaliação dos indicadores de estresse oxidativo, com análises de malondialdeído (MDA) e carbonilação de proteínas. O outro hemisfério foi fixado em parafina para análise histológica. O nível de MDA foi significativamente mais elevado no grupo de ratos machos inoculados ($p=0,0380$), enquanto nas fêmeas inoculadas houve uma tendência de elevação. A carbonilação de proteínas indicou que tanto os grupos de machos ($p=0,0066$) quanto de fêmeas ($p=0,0045$) inoculados apresentaram valores mais altos. Na análise histológica, os grupos inoculados mostraram um escore significativamente mais elevado em comparação com os grupos controle. O estudo evidenciou a presença de estresse oxidativo no cérebro dos ratos, e as alterações observadas nos resultados de MDA e carbonilação indicam uma resposta alterada à NCC experimental. O modelo experimental de NCC demonstrou que o estresse oxidativo está presente.

Palavras-chave: Neurocisticercose, *Taenia crassiceps*, Cisticercose e Estresse oxidativo.

Abstract

Neurocysticercosis (NCC) is caused by the larval presence of *Taenia solium* (*T. solium*), known as cysticerci, in the brains of humans who have ingested the parasite's eggs. The extraparenchymal form of NCC has a more aggressive course because cysts located in the cerebrospinal fluid compartments can trigger an intense inflammatory reaction. To study oxidative stress, we used an experimental model of extraparenchymal NCC in rats. The animals were divided into four groups: 20 infected males, 20 infected females, 5 control males, and 5 control females. Inoculation in the infected groups was performed by puncturing the subarachnoid space of the cisterna magna at the occipito-cervical transition and injecting 50 viable cysts of *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*). After three months of inoculation, all animals were euthanized. The brains were collected and sectioned into two hemispheres. One hemisphere was immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a -80°C freezer for evaluation of oxidative stress indicators, with analyses of malondialdehyde (MDA) and protein carbonylation. The other hemisphere was fixed in paraffin for histological analysis. The MDA level was significantly higher in the inoculated male rats ($p=0.0380$), while in the inoculated females, there was a trend towards elevation. Protein carbonylation showed that both the male ($p=0.0066$) and female ($p=0.0045$) inoculated groups had higher values. In the histological analysis, the inoculated groups exhibited a significantly higher score compared to the control groups. The study demonstrated the presence of oxidative stress in the rats' brains, and the observed changes in MDA and carbonylation results indicate an altered response to experimental NCC. The experimental model of NCC revealed that oxidative stress is present.

Keywords: Neurocysticercosis, *Taenia crassiceps*, Cysticercosis and Oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática dos procedimentos experimentais

Figura 2: Manutenção e seleção de cepas de *T. crassiceps*.

Figura 3: Fluxograma do delineamento experimental.

Figura 4. Infiltrado inflamatório no modelo experimental de NCC extraparenquimatosa.

Gráfico 1: Comparação da concentração de MDA entre os grupos experimentais.

Gráfico 2: Comparação da proteína carbonilada entre os grupos experimentais.

Gráfico 3: Classificação de intensidade de células inflamatórias no tecido cerebral.

Lista de abreviaturas e siglas

CEUA: comissão de ética no uso de animais

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

IFN- γ : interferon gama

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

M. corti: *Mesocystoides corti*

MDA: malondialdeído

NCC: neurocisticercose

PIC: pressão intracraniana

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. solium: *Taenia solium*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Th1 - Linfócito T Helper

Th2 - Linfócito T Helper

Sumário

Introdução.....	12
Neurocisticercose.....	12
Modelos experimentais de NCC.....	15
Estresse oxidativo.....	18
Justificativa.....	21
Objetivos.....	23
Métodos.....	25
Animais de experimentação.....	25
Cálculo do tamanho amostral.....	25
Delineamento experimental.....	25
Parasitas e inoculações.....	26
Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo.....	27
Malondialdeído.....	27
Carbonilação de proteínas.....	28
Análise histológica.....	28
Análise estatística.....	29
Resultados.....	31
Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo.....	31
Avaliação do infiltrado linfocitário.....	33
Discussão.....	35
Conclusão.....	40
Referências.....	42
Artigo científico em inglês.....	48
Comprovante de aprovação do projeto científico no CEUA.....	49

Introdução

Introdução

A cisticercose é uma infecção que afeta tanto humanos quanto suínos e é causada pelo desenvolvimento larval do parasita cestódeo *Taenia solium* (*T. solium*). A infecção ocorre pela ingestão de ovos eliminados nas fezes de um hospedeiro humano infectado com a tênia (MALLA *et al.*, 2018). O ciclo de vida de *T. solium* envolve dois hospedeiros: o hospedeiro definitivo é o ser humano, que abriga a tênia adulta e desenvolve a teníase (infecção intestinal por tênia adulta). Os suínos atuam como hospedeiros intermediários e abrigam os cisticercos (as larvas da tênia), desenvolvendo a cisticercose. Além disso, os seres humanos podem ser hospedeiros intermediários acidentais ao abrigar os cisticercos em seus tecidos biológicos. Embora a teníase em si não esteja associada a doenças graves, as pessoas que eliminam ovos de *T. solium* podem infectar suínos e outros humanos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022).

Quando o parasita invade o parênquima cerebral, o sistema ventricular, o espaço subaracnóideo ou a medula espinhal para formar cisticercos, a condição é denominada neurocisticercose (NCC) (FÁTIMA *et al.*, 2023). Em humanos, a NCC pode resultar em doença grave, dependendo do número, da localização e da carga de cistos, bem como da reação inflamatória desencadeada pelo hospedeiro (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022).

Neurocisticercose

A NCC é uma doença de prevalência mundial, sendo endêmica em países em desenvolvimento. Possui um alto impacto social e na saúde pública, especialmente na América Latina, na África Subsaariana e no Sudeste Asiático. A NCC tem uma taxa de incidência que varia de 2,5 a 8,3 milhões de pessoas (WINKLER *et al.*, 2009; SIBAT, 2013; WINKLER A. S., RICHTER H., 2015; BUTALA *et al.*, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma prevalência de 50 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo pelo complexo teníase-cisticercose (WHO, 2006). Estima-se que a taxa de mortalidade mundial devido à NCC seja de cerca de 50.000 por ano (ROMÁN *et al.*, 2000). Além disso, a NCC é uma importante causa prevenível de epilepsia secundária em todo o mundo, afetando cerca de 5 milhões de pessoas. Na América Latina e no Caribe, estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção, sendo que entre 0,45

e 1,35 milhão de pessoas apresentem epilepsia atribuída à NCC (MARTINS-MELO *et al.*, 2017).

O estudo de Martins-Melo e colaboradores (2017) apresentou dados referentes à NCC no Brasil. Eles analisaram os casos de mortes relacionadas à NCC ocorridas entre 2000 e 2011. Durante esse período, foram registradas 1.829 mortes, sendo 1.130 (61,8%) como causa básica e 699 (38,2%) como causa associada. O número médio de mortes relacionadas à NCC foi de 152,4. As regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas, com os estados do Paraná (região Sul, 2,38 óbitos por 1.000.000 habitantes), Minas Gerais (região Sudeste, 1,64 óbitos por 1.000.000 habitantes) e Goiás (região Centro-Oeste, 1,59 óbitos por 1.000.000 habitantes) tendo as maiores taxas médias anuais de mortalidade.

Rodriguez-Rivas e colaboradores (2022) analisaram dados sobre hospitalizações decorrentes de NCC no Brasil, Equador, Colômbia e México. Eles identificaram uma redução nas taxas de hospitalização por NCC no Brasil (de 0,30 para 0,11 por 100.000 habitantes) e no Equador (de 4,76 para 0,73 por 100.000 habitantes). Na Colômbia, observou-se uma tendência de aumento dos casos de NCC (de 0,49 para 2,33 por 100.000 habitantes). Os autores destacam que, apesar da tendência de queda nas hospitalizações, os casos de NCC persistem nesses países e a vigilância e o tratamento continuam sendo necessários. Na Europa, a NCC é considerada uma doença rara e de baixa prevalência, mas deve ser incluída como diagnóstico diferencial, especialmente em casos com histórico de viagens ou migração (DOMINIK STELZLE *et al.*, 2022).

As taxas de mortalidade no Brasil apresentaram uma tendência de queda significativa ao longo dos últimos anos (MARTINS-MELO *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-RIVAS *et al.*, 2022). Apesar da redução geral na prevalência e na mortalidade decorrente da doença, o estudo da NCC continua sendo relevante por várias razões: a alta morbidade associada à condição e o impacto significativo nos recursos de saúde pública destinados ao seu tratamento; a impossibilidade de erradicar a doença globalmente, apesar da disponibilidade de tratamento e do conhecimento do ciclo de vida do parasita; e a recente reemergência da doença em países considerados desenvolvidos, atribuída à importação de casos por imigrantes (COYLE *et al.*, 2012).

A NCC é pleomórfica devido às diferenças individuais no número, na topografia e no estágio evolutivo das lesões, bem como na resposta imune do hospedeiro à infecção (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022). Suas manifestações clínicas são heterogêneas, variando desde dores de cabeça e convulsões até déficits focais e

hipertensão intracraniana, embora se estime que aproximadamente 50% dos pacientes sejam assintomáticos (MONTEIRO; BLEGGI, 2011). A topografia do cisticerco também permite a classificação da doença em duas formas principais: a forma parenquimatosa, em que o parasita está alojado no tecido encefálico, sendo esta a forma mais comum, com a epilepsia sendo um sintoma frequente (GRIPPER; WELBURN, 2017); e a forma extraparenquimatosa, na qual o cisticerco está localizado nos compartimentos líquoricos, espaço subaracnóideo e ventrículos, levando a um quadro mais grave, frequentemente evoluindo para hidrocefalia e síndrome de hipertensão craniana, com altas taxas de morbimortalidade (MARCIN SIERRA *et al.*, 2017).

A heterogeneidade da NCC afeta o tratamento, e as opções terapêuticas disponíveis são baseadas na localização dos parasitas e em critérios clínicos. Um desafio significativo é o acesso dos pacientes em países endêmicos às tecnologias de neuroimagem, como a ressonância magnética (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2022).

A abordagem do tratamento da NCC extraparenquimatosa apresenta muitas incógnitas em comparação com a forma parenquimatosa, conforme evidenciado pelas diretrizes de tratamento da NCC. Alguns pontos importantes para orientar o tratamento são: 1) a presença de inflamação, que é o principal mecanismo patogênico e deve ser tratada adequadamente antes de iniciar o tratamento cisticida; e 2) a pressão intracraniana (PIC): em casos de hipertensão intracraniana, o tratamento da pressão elevada deve ser priorizado (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2022).

A eficácia dos anti-helmínticos é menor quando comparada aos cistos parenquimatosos. O fato de os parasitas estarem localizados em um meio acelular, como o líquido cefalorraquidiano, dificulta o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente para a destruição dos parasitas. Para aumentar a eficácia do tratamento, são utilizadas duas estratégias: a administração de doses maiores de anti-helmínticos e a extensão do período de tratamento. Alguns autores defendem que a administração deve ser mantida até que os sinais de degeneração do cisticerco sejam visíveis nos exames de imagem (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2024).

A cirurgia para NCC extraparenquimatosa apresenta riscos e desafios que dependem da localização dos cistos. Quando os cistos estão localizados na região subaracnóidea basal, a cirurgia pode acarretar um risco considerável de lesão aos nervos cranianos, aos grandes vasos e ao parênquima cerebral. Conforme mencionado anteriormente, uma ressonância magnética pré-operatória é crucial para avaliar sinais de inflamação ativa, que podem dificultar a remoção cirúrgica dos cistos. A cirurgia deve ser

considerada em casos com pressão intracraniana elevada ou compressão de estruturas com risco de déficits permanentes, como a compressão do nervo óptico com piora visual (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2024).

Para a localização intraventricular, a remoção cirúrgica dos cistos pode ser tão eficaz quanto o tratamento clínico. As vantagens da cirurgia nesses casos incluem a possibilidade de tratar a hidrocefalia simultaneamente, reduzindo a necessidade de drenagem líquórica, e a possibilidade de evitar a administração adicional de agentes anti-helmínticos, caso todos os cistos sejam removidos (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2022).

Modelos experimentais de NCC

Modelos experimentais têm sido utilizados para o estudo da NCC. Esses modelos laboratoriais visam mimetizar a doença, servindo como ferramentas úteis para a pesquisa e avaliação da NCC. Os modelos de NCC empregam diferentes agentes parasitários, como *T. solium*, *T. crassiceps* e *M. corti*, e utilizam uma variedade de espécies animais, incluindo suínos, ratos, camundongos, hamsters, macacos e chinchilas (DEL BRUTTO, 2014).

O modelo de NCC utilizando ratos infectados intracranialmente com oncosferas ativadas de *T. solium* apresentou cistos, ou cisticercos, que se desenvolveram e exibiram características idênticas às observadas em hospedeiros naturais, como humanos e suínos. Os cistos estavam localizados tanto no tecido cerebral parenquimatoso quanto extraparenquimatoso, similar aos hospedeiros naturais. Outras características, como a presença de cisticercos maduros três meses após a infecção e a viabilidade dos cistos, indicam que *Rattus norvegicus* é um modelo útil para o estudo da doença. A idade do rato é crucial para o sucesso da infecção: o uso de animais mais jovens (<19 dias de idade) apresentou taxas de infecção e cargas parasitárias mais elevadas do que ratos mais velhos, sugerindo uma relação com a maturidade da resposta imune. Os ratos infectados desenvolveram endoencefalite ventricular, meningite, hidrocefalia e angiogênese do tecido cerebral com padrões semelhantes aos relatados em humanos e suínos com NCC. O estudo revelou extravasamento de IgG no tecido adjacente ao cisto, demonstrando ruptura da barreira hematoencefálica, espessamento das paredes dos vasos sanguíneos ao redor dos cistos e alterações na arquitetura do tecido cerebral próximo ao local de

implantação do cisticerco, devido à compressão física causada pelo parasita (VERASTEGUI *et al.*, 2015).

O padrão do infiltrado inflamatório no modelo de NCC em ratos é semelhante ao observado na NCC humana, incluindo um elevado número de células plasmáticas, macrófagos, linfócitos T e um baixo número de eosinófilos. O estudo demonstrou que o modelo de NCC utilizando ratos é viável para a investigação da resposta imune do hospedeiro, bem como para o teste de diferentes medicamentos e esquemas terapêuticos. Além disso, foi possível obter líquido cefalorraquidiano, e o modelo revelou ser de baixo custo, fácil de manusear e com alta taxa de infecção (VERASTEGUI *et al.*, 2015).

Em suínos, a *T. solium* foi utilizada, e o modelo de infecção intramuscular concluiu que o estudo da NCC não foi eficaz (VERASTEGUI *et al.*, 2000). Além disso, o modelo com infecção oral resultou em baixas taxas de infecção (SANTAMARÍA *et al.*, 2002).

Um estudo com suínos naturalmente infectados permitiu avaliar a resposta imune associada aos diferentes estágios da larva do parasita (metacestóide). Descobriu-se que uma maior expressão de interleucina 10 (IL-10) está associada à presença de cistos viáveis (SINGH *et al.*, 2013).

Os cistos em degeneração apresentaram uma resposta imune inflamatória Th1 e níveis significativamente aumentados de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8). Em contraste, os cistos calcificados mostraram uma resposta imune mista Th1 e Th2, com níveis elevados de interleucina 4 (IL-4), IL-10, TNF- α e IL-6. O estudo indicou uma forte resposta regulatória de IL-10 e citocinas Th1 em cistos viáveis e em degeneração, respectivamente. Por outro lado, os cistos calcificados apresentaram uma resposta mista, com componentes anti-inflamatórios (IL-4), reguladores (IL-10) e pró-inflamatórios (TNF- α e IL-6). Verificou-se que as citocinas Th1 e Th2 desempenham um papel na gravidade da doença (SINGH *et al.*, 2013).

O estudo de Fleury e colaboradores (2015) utilizou a implantação cirúrgica de oncosferas no sistema nervoso central de suínos e obteve sucesso na infecção. A maioria dos parasitas estava calcificada e cercada por uma resposta inflamatória exacerbada, composta principalmente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e eosinófilos, além de apresentar expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e interleucina 17 (IL-17) e elevada expressão da citocina reguladora IL-10. Embora a infecção tenha produzido anticorpos específicos, nenhum sinal neurológico foi observado.

O uso de *T. crassiceps* é amplamente adotado no modelo de teníase e está intimamente relacionado a *T. solium*. Ambos pertencem ao mesmo gênero e possuem uma significativa similaridade antigênica (SCIUTTO *et al.*, 1990). A infecção intracerebral de camundongos permitiu a identificação significativa de citocinas Th1 (KHALIFA; TEALE; MOHAMADAIN, 2012).

O estudo da NCC com a inoculação intracerebral de *T. crassiceps* permitiu a análise do padrão inflamatório em duas linhagens de camundongos: Balb/C e C57BL/6. Ambas as linhagens promoveram a necrose dos parasitas 90 dias após a infecção. No entanto, em camundongos C57BL/6, a necrose ocorreu de forma mais eficiente a partir dos 60 dias após a infecção (MATOS-SILVA *et al.*, 2012).

Na linhagem BALB/c, o padrão inflamatório agudo, caracterizado principalmente por células polimorfonucleares, edema, perivascularite e meningite, foi significativamente mais intenso do que o observado nos camundongos C57BL/6. Por outro lado, a linhagem C57BL/6 desenvolveu um padrão inflamatório crônico com predominância de células mononucleares, mostrando-se mais eficiente no controle dos cisticercos (MATOS-SILVA *et al.*, 2012).

A hipótese levantada é que a linhagem de camundongos BALB/c possui uma menor capacidade de induzir necrose nos parasitas devido ao predomínio de células polimorfonucleares no infiltrado inflamatório ao longo da infecção (MATOS-SILVA *et al.*, 2012).

Um estudo que utilizou o tratamento com albendazol durante o curso da hidrocefalia permitiu analisar os volumes ventriculares antes e depois do tratamento. Os autores encontraram uma correlação positiva entre o grau de aumento dos ventrículos e o dano tecidual. Na avaliação histológica, foi identificado um infiltrado de leucócitos mononucleares em regiões perivasculares e periependimárias, no plexo coróide e nas membranas meníngeas (FOGAROLI *et al.*, 2019).

Outro estudo sobre a resposta inflamatória e o dimorfismo sexual em ratos infectados por *T. crassiceps* apresentou a primeira evidência de dimorfismo sexual na neuroinflamação que acompanha a NCC extraparenquimatosa experimental. A reação inflamatória associada à infecção subaracnóidea por *T. crassiceps* foi mais intensa em ratas do que em ratos. As ratas apresentaram uma maior concentração de células imunes na aracnóide, maior astrogliose reativa na região periventricular, maior produção de citocina pró-inflamatória in situ (IL-6), bem como de citocina anti-inflamatória (IL-10), e

hidrocefalia mais pronunciada na ressonância magnética. Níveis mais elevados de IL-6 foram observados nas fêmeas, demonstrando um padrão pró-inflamatório. Os autores relacionaram essa resposta mista à regulação endócrina, em particular aos níveis de esteróides (MOREIRA *et al.*, 2023).

O agente *M. corti* foi descrito em um modelo de NCC em camundongos, permitindo a elucidação dos mecanismos subjacentes envolvidos nos diferentes estágios da NCC. A resposta inicial a *M. corti* no cérebro caracteriza-se por uma resposta do tipo Th1, com infiltração de macrófagos, neutrófilos e células T expressando citocinas pró-inflamatórias, seguida pela infiltração de células T e células B (ALVAREZ *et al.*, 2010).

Estresse oxidativo

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico que desempenha funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas. Eles também participam dos mecanismos de defesa durante infecções. Contudo, a produção excessiva de radicais livres pode levar a danos oxidativos (PIZZINO *et al.*, 2017). A inflamação, por sua vez, faz parte de uma resposta biológica complexa a estímulos nocivos e é uma importante fonte de radicais livres. Estes são liberados pelas células do sistema imunológico para proteger o organismo contra patógenos invasores, mas também podem causar danos aos tecidos (JELINEK *et al.*, 2021).

O desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes leva à instalação do processo de estresse oxidativo. Esse processo resulta na oxidação de biomoléculas, acarretando a perda de suas funções biológicas ou o desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o potencial dano oxidativo contra células e tecidos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). A cronicidade desse processo possui relevantes implicações no processo etiológico de diversas enfermidades (GREEN *et al.*, 2004).

O cérebro é altamente vulnerável a danos oxidativos devido à sua elevada demanda por oxigênio, à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, que são facilmente oxidados, à abundância de íons com atividade redox e à relativa escassez de um sistema de defesa antioxidante eficiente (OGAWA, 1994).

As lesões provocadas pela peroxidação lipídica têm um efeito tóxico nas paredes dos vasos arteriais cerebrais, resultando em alterações semelhantes àsquelas observadas

no vasoespasma crônico. O cérebro é um dos órgãos mais afetados pelo estresse oxidativo. Devido à sua riqueza em ácidos graxos poli-insaturados e ao elevado consumo de oxigênio, há uma consequente geração de altas taxas de radicais livres provenientes de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (JELINEK *et al.*, 2021).

O papel do estresse oxidativo em casos de NCC foi relatado na literatura por Prasad e colaboradores (2012) em estudos com crianças (AYCICEK; ISCAN, 2006). Embora os radicais livres tenham uma vida curta e não possam ser medidos diretamente, sua atividade pode ser avaliada indiretamente por meio da estimativa de seus subprodutos e dos níveis de antioxidantes.

O MDA é um dos compostos derivados da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e tem sido amplamente utilizado como biomarcador para medir o estresse oxidativo. Os efeitos induzidos por esses epítomos de MDA estão associados à expressão de genes pró-inflamatórios e à ativação de diversas vias de sinalização inflamatória (BUSCH; BINDER, 2017). O MDA pode ser quantificado em diversas amostras biológicas, como sangue, urina e condensado do ar exalado de pacientes afetados por uma ampla gama de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e neurodegenerativas (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

A carbonilação de proteínas é um tipo de oxidação proteica que pode ser promovida por EROs. Geralmente, refere-se a um processo que forma cetonas ou aldeídos reativos, os quais podem reagir com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas. A oxidação direta das cadeias laterais de lisina, resíduos de arginina, prolina e treonina, entre outros aminoácidos, na reação de "carbonilação primária de proteínas" resulta na formação de produtos proteicos detectáveis por DNPH (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010).

Justificativa

Justificativa

O estresse oxidativo presente nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção pode levar a danos oxidativos. O modelo de NCC extraparenquimatosa permite o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa patologia; no entanto, as informações sobre os níveis de estresse oxidativo nesse modelo, bem como sobre as diferenças entre os gêneros, são escassas. Assim, avaliamos os níveis de estresse oxidativo neste modelo.

Objetivos

Objetivos

- Objetivos principais:
 - Avaliar o MDA no modelo experimental de NCC extraparenquimatosa com ratos machos e fêmeas.
 - Avaliar a carbonilação de proteínas no modelo experimental de NCC extraparenquimatosa com ratos machos e fêmeas.
 - Analisar o infiltrado linfocitário no modelo experimental de NCC extraparenquimatosa com ratos machos e fêmeas.

Métodos

Métodos

Animais de experimentação

Os animais foram manuseados de acordo com protocolos éticos e com a legislação vigente. O projeto de pesquisa e todos os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu. Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), 25 machos e 25 fêmeas, com 5 semanas de idade, pesando entre 130-150 g, provenientes do Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu.

Os animais foram mantidos em sala de manutenção de ratos nos biotérios da Unipex com controle de luz (ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro), temperatura (aproximadamente 21° C) e de exaustão de ar. Foram alojados de dois a três animais por caixa de tamanho grande (com área disponível de 1394 cm²), com fundos sólidos forrados com substrato de maravalha, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água filtrada e receberam enriquecimento ambiental a cada troca de caixa com 5 bolas de papel de celulose.

Cálculo do tamanho amostral

Em estudos experimentais prévios (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2019) há uma taxa de mortalidade de 33% dos animais quando submetidos à inoculação e de 70% de sucesso de indução de NCC. Assim, foram necessários 50 animais. O tamanho amostral foi estimado pressupondo amostragem aleatória simples, erros tipo I e II iguais a 0,05 e 0,20 respectivamente.

Delineamento experimental

Quarenta ratos (20 machos e 20 fêmeas) receberam injeção subaracnóidea de 50 cistos de *T. crassiceps* (Figura 1A), e foram mantidos vivos até três meses pós-inoculação. Após o período observacional, os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental, e seus cérebros foram colhidos após ampla craniectomia. A

presença de cistos no espaço subaracnóideo após a colheita do cérebro confirmou a inclusão do animal (Figura 1B), enquanto os ratos que não apresentavam cistos (não infectados) foram descartados. O hemisfério direito foi embebido em paraformaldeído tamponado a 4%, e o hemisfério esquerdo foi congelado e armazenado a -80°C para posterior quantificação de marcadores de estresse oxidativo (MDA e proteína carbonilada). Dez animais (cinco machos e cinco fêmeas) não receberam qualquer intervenção e foram submetidos ao mesmo protocolo para eutanásia e processamento tecidual na mesma idade dos animais inoculados (Figura 1C).

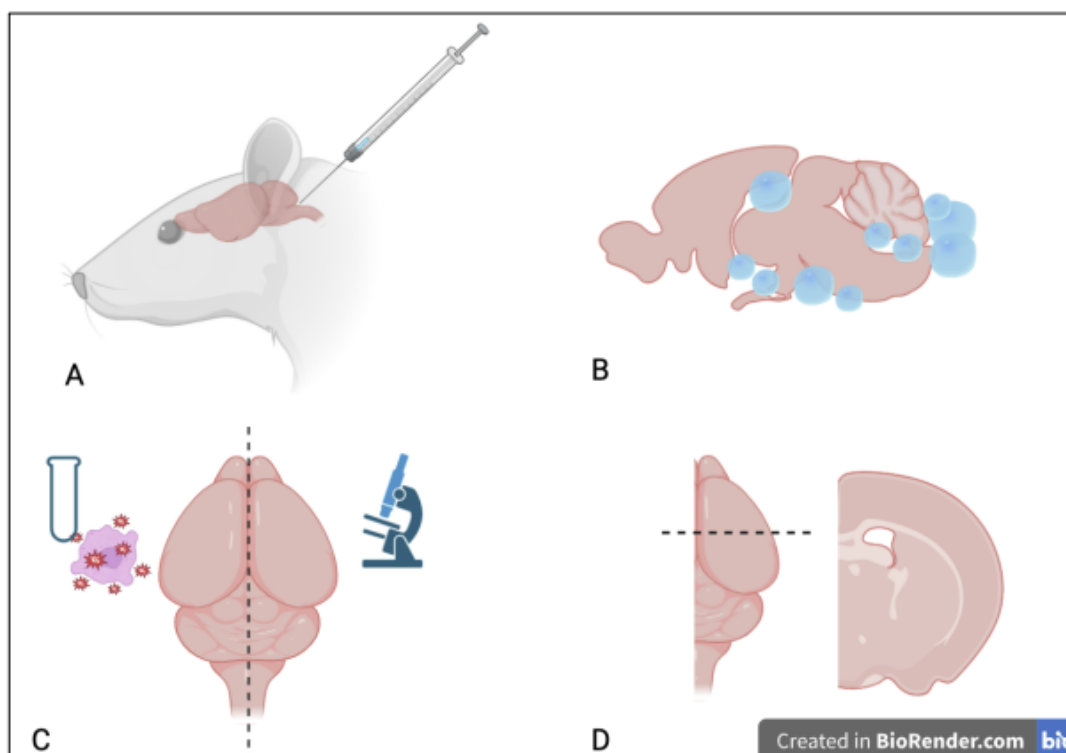


Figura 1. Representação esquemática dos procedimentos experimentais. A: a injeção do cisto foi realizada na cisterna magna, ou seja, no espaço subaracnóideo entre a porção pósterio-inferior do cerebelo e a porção dorsal da medula oblonga. B: três meses após a inoculação, os cistos puderam ser observados em todo o espaço subaracnóideo, localizados predominantemente na convexidade basal do cérebro e tronco encefálico. C: o hemisfério direito foi utilizado para análise histológica, e o hemisfério esquerdo para ensaios de estresse oxidativo. D: as vistas dorsal e coronal ao nível da avaliação histológica do tecido.

Parasitas e inoculações

Foram utilizados cistos de *T. crassiceps* mantidos na cavidade peritoneal de camundongos da linhagem *Swiss*, provenientes do projeto de manutenção e replicação de cepas registrado no Comitê de ética de uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu sob protocolo 1255/2017 (Figura 2).

Para a inoculação intracraniana nos animais, os parasitas foram coletados de modo asséptico da cavidade peritoneal dos camundongos. Após a eutanásia dos camundongos, a cavidade peritoneal foi aberta, os cistos foram obtidos e colocados em placas de petri e foram selecionados conforme a viabilidade morfológica (membrana íntegra e sem calcificações) e tamanho adequado para passagem pela agulha de punção. Os cistos viáveis foram separados para inoculação direta nos animais do grupo cistos (50 cistos por rato, volume total = 0,2ml).

O grupo controle não foi inoculado e foram observados durante 90 dias.

Para os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (80mg/ml), xilazina (10mg/ml) e solução fisiológica 0,9% numa dose de 2 ml / kg (solução anestésica= 0,8 ml de cetamina + 0,5 ml de xilazina + 0,7 ml de solução fisiológica 0,9% = 2 ml).

A inoculação foi realizada após incisão de 1 cm na pele na transição occipitocervical, com punção suboccipital da cisterna magna com agulha de 25G. A sutura da pele foi realizada com fio mononylon 4.0.

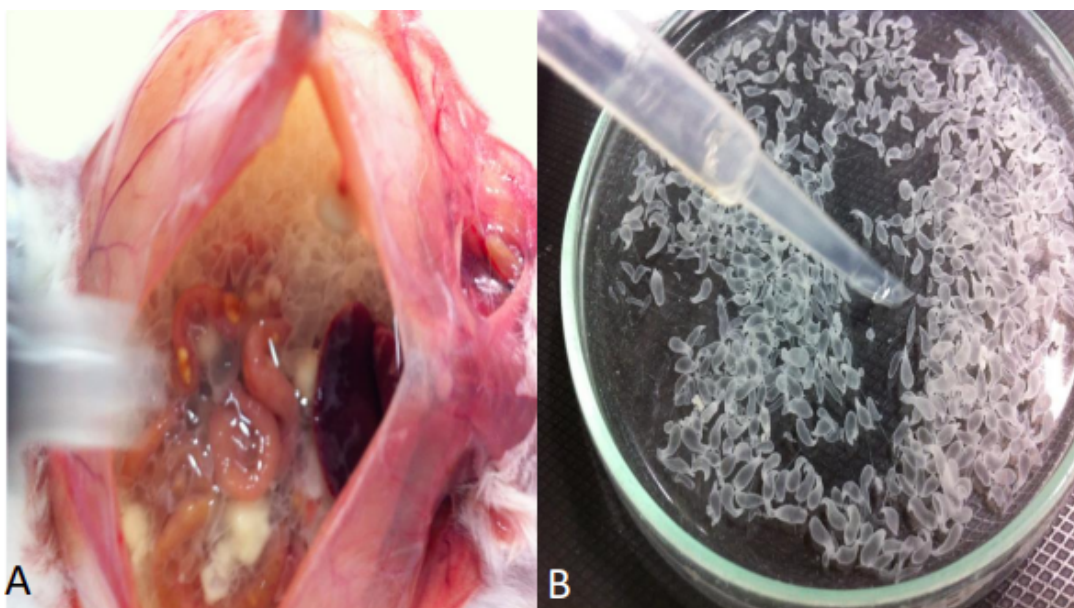


Figura 2: Manutenção e seleção de cepas de *T. crassiceps*. À esquerda, observam-se os cistos de *T. crassiceps* em cavidade peritoneal de camundongo, local onde se replicam por brotamento e são mantidos, seis meses após terem recebido inoculação de dez cistos vivos. À direita, observam-se os cistos de *T. crassiceps* em placa de Petri para seleção manual com seringa antes das inoculações.

Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo

Malondialdeído

O nível de MDA foi usado para avaliar a peroxidação lipídica. Em resumo, 250 μL de sobrenadante do tecido cerebral foi usado e adicionados a 750 μL de ácido tricloroacético a 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm, durante 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ácido tiobarbitúrico na proporção de 0,67% (1:1) e as amostras foram aquecidas por 15 minutos a 100°C. Após o resfriamento, foi realizada a leitura a 535 nm no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de MDA foi obtida pelo coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{-cm}^{-1}$) e a absorção das amostras e o resultado final relatado em nmol/g de proteína (GARCIA, *et al.*, 2021).

Carbonilação de proteínas

As proteínas carboniladas presentes no cérebro foram mensuradas por meio de método espectrofotométrico. Para tal, 100mg de tecido cerebral foram homogeneizados em solução gelada de PBS (1mL, pH 7.4) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA® Werke Staufen/Germany, e centrifugadas a 800g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi incubado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) durante 1 hora para a derivatização das proteínas carboniladas. Logo depois, as amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes com solução etanol/acetato de etila para retirada do excesso de DNPH, evitando a quantificação de cromóforos não ligados à proteína carbonilada. Por fim, foi adicionado cloridrato de guanidina 6M ao sedimento lavado e em seguida realizada a leitura em comprimento de onda de 370nm. Concentrações de proteínas totais nas amostras foram quantificadas por meio de testes comerciais para ajuste de valores das proteínas carboniladas. As concentrações de proteínas carboniladas foram expressas em µg/g de proteína.

Análise histológica

Um hemisfério do encéfalo foi seccionado transversalmente na topografia do quiasma óptico, utilizando-se matriz de encéfalo (Insight, Brasil) para cortes comparáveis. Os fragmentos foram, em seguida, colocados em cassetes e mantidos em formaldeído por 24 horas em temperatura ambiente. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em banhos de álcool, clarificadas em xilol e então parafinadas. Para análise da morfologia geral do encéfalo, os blocos foram seccionados em micrótomo com espessura de 5µm e coradas com hematoxilina e eosina. Foram realizados cortes coronais, a o nível do quiasma óptico como referências externas, foi utilizada uma matriz para o corte de cérebro de rato (acessório construído em acrílico cristal transparente para corte histológico. Dimensões (CxLxA): 45mm x 29mm x 19mm Espessura do corte fatiado: 0,5 mm). Após a seleção da região alvo as lâminas foram confeccionadas e coradas com Hematoxilina e Eosina para análise do tecido. A análise histológica foi realizada no espaço subaracnóideo (região do quiasma) (Figura 1D). A análise morfométrica foi

realizada de forma semi-quantitativa graduando o infiltrado linfocitário na interface pia-aracnóide em ausente, sem visualização de linfócitos (0), discreta, linfócitos escassos e esparsos (+), moderada, linfócitos presentes focalmente, (++), ou intensa, muitos linfócitos difusamente (+++).

Análise estatística

Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para dados não paramétricos ANOVA seguido de Tukey para dados paramétricos. Para as análises, foram utilizados os softwares SPSS (v. 21.0) e GraphPad (v. 5.0).

Resultados

Resultados

Dos 50 animais utilizados (Figura 3), houve óbito na sequência da inoculação de 7 animais do grupo machos inoculados e 8 animais do grupo fêmeas inoculadas. Assim, a mortalidade pós-inoculação foi de 35% e 40% respectivamente. No desenvolvimento do projeto os animais foram observados por 90 dias, a partir da inoculação.

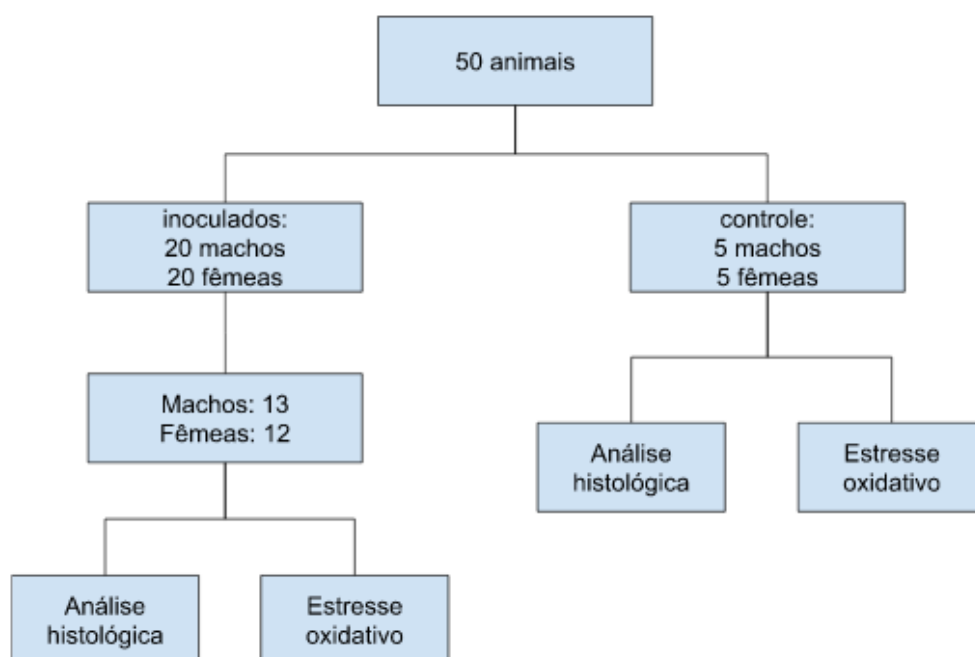


Figura 3: Fluxograma do delineamento experimental.

Avaliação dos indicadores de estresse oxidativo

Foram realizadas análises de MDA e carbonilação de proteínas nos encéfalos dos grupos inoculados e controles machos e fêmeas. O Gráfico 1 mostra uma média significativamente maior de níveis de malondialdeído ($15,6 \pm 5,8$ nmol/mg) em ratos infectados do que em ratos controle ($11,3 \pm 3,2$ nmol/g), ($p = 0,048$). Os níveis de MDA não apresentaram diferença significativa entre machos (Figura 3B, $p = 0,059$) e fêmeas

(Gráfico 1C, $p = 0,305$). Os machos infectados apresentaram concentrações mais elevadas de MDA que as fêmeas ($p = 0,024$, Gráfico 1D).

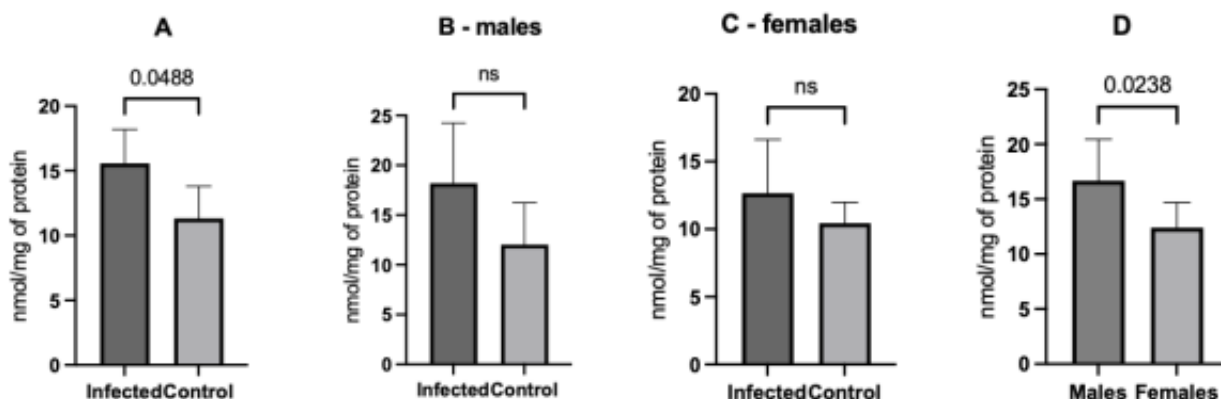


Gráfico 1: Comparação da concentração de MDA entre os grupos experimentais. Ao considerar todos os animais infectados, a concentração média foi superior à dos animais controle (A). Porém, as diferenças deixaram de ser significativas (ns) quando se analisaram animais machos (B) e fêmeas (C) com seus controles. Além disso, considerando os animais infectados, os machos apresentaram maior concentração de MDA que as fêmeas (D).

Os animais infectados apresentaram maior concentração de proteína carbonilada que os controles ($789,2 \pm 128,7$ vs $582,5 \pm 30,3$ $\mu\text{g/g}$, $p < 0,001$); esse efeito também foi observado quando comparamos apenas ratos machos ($p = 0,007$) e fêmeas ($p = 0,005$) (Gráfico 2). Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas infectados ($p = 0,513$).

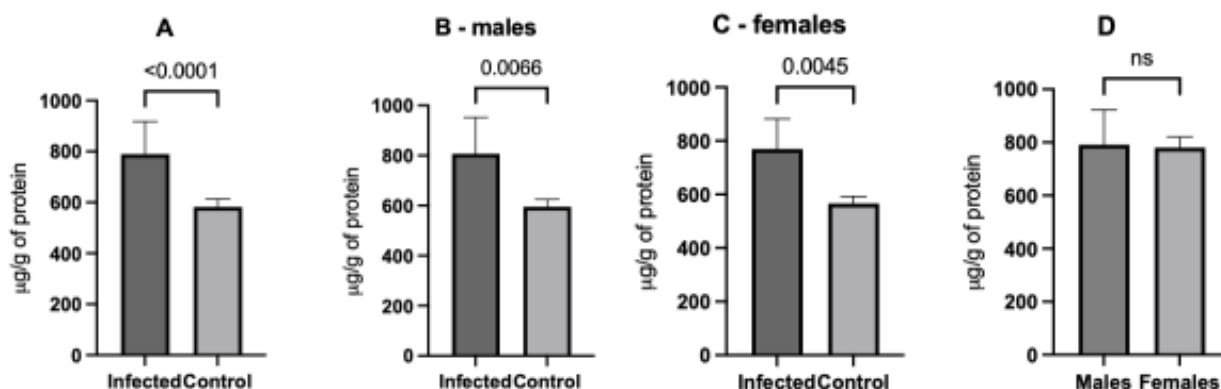


Gráfico 2: Comparação da proteína carbonilada entre os grupos experimentais. Os animais infectados apresentaram maiores concentrações quando comparados todos os animais (A), os machos (B) e as fêmeas (C) com seus respectivos controles. Não houve diferença entre machos e fêmeas infectados (D).

Avaliação do infiltrado linfocitário

Para a análise histológica utilizamos a metade de cada encéfalo de cada animal do grupo controle e infectado.

A Figura 3 apresenta os padrões de score de infiltrado linfocitário na interface pia-aracnóide com muitos linfócitos difusamente (Figura 4: A e C) e a interface pia-aracnóide sem visualização de linfócitos (Figura 3: B e D).

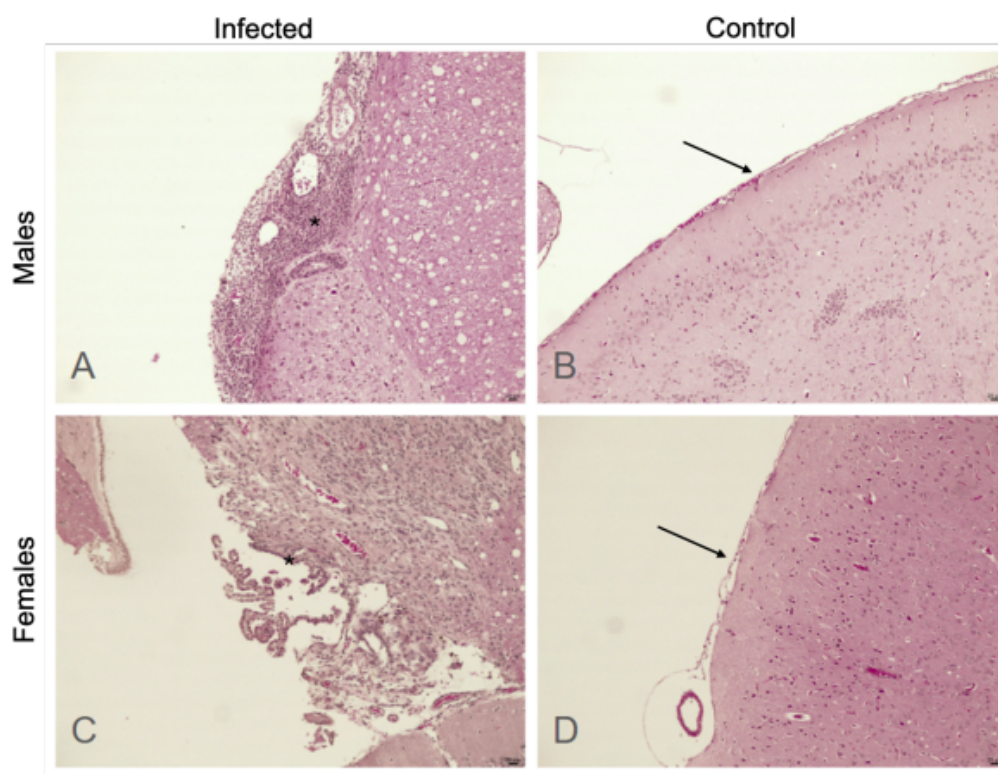


Figura 4. Infiltrado inflamatório no modelo experimental de NCC extraparenquimatosa. A. Lâmina histológica de um rato infectado corada com HE evidenciando o infiltrado linfocitário na interface pia-aracnóide com muitos linfócitos difusamente (+++). B. Lâmina histológica de um rato controle corada com HE evidenciando a interface pia-aracnóide sem visualização de linfócitos (0). C. Lâmina histológica de uma rata infectada corada com HE evidenciando o infiltrado linfocitário na interface pia-aracnóide com muitos linfócitos difusamente (+++). D. Lâmina histológica de uma rata controle corada com HE evidenciando a interface pia-aracnóide sem visualização de linfócitos (0).

A avaliação histológica revelou uma interface aracnóide-pia-máter-cérebro normal nos animais controle, com fina e delicada camada aracnóide justaposta à pia-máter, com poucos linfócitos detectáveis. Entre os animais infectados foram observados graus variáveis de infiltração linfocitária, com muitos casos de aracnóides espessados e linfócitos nos focos de infiltração ou distribuição difusa (Figura 3). A mediana do escore de infiltração de linfócitos foi maior nos animais infectados do que nos animais controle (3,0 vs 1,0, $p < 0,001$). Essa diferença permaneceu significativa entre machos ($p = 0,038$) e fêmeas ($p = 0,003$). Não encontramos diferenças significativas entre os ratos machos e fêmeas infectados ($p = 0,721$) (Gráfico 3).

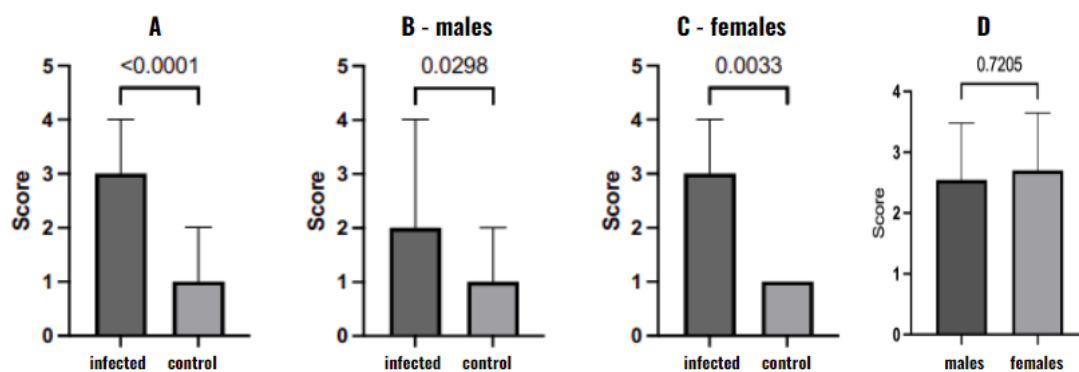


Gráfico 3: Classificação de intensidade de células inflamatórias no tecido cerebral. Os animais infectados apresentaram maiores “Scores” quando comparados todos os animais (A), os machos (B) e as fêmeas (C) com seus respectivos controles. Não houve diferença entre machos e fêmeas infectados (D).

Discussão

Discussão

A inflamação ocorre ao longo da história natural da NCC, mesmo em casos de cistos calcificados (HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2015). Embora desempenhe um papel fundamental na destruição eficaz do parasita, esse efeito é ambíguo, pois também está relacionado à gravidade dos sintomas. Como o uso de anti-helmínticos pode desencadear inflamação ao aumentar a exposição dos parasitas à vigilância imunológica, é necessário o uso concomitante de corticosteróides para controlar o possível aumento da gravidade (TOLEDO *et al.*, 2018). Assim, o controle da inflamação sem comprometer a eficácia dos cisticidas é um alvo significativo de investigação.

EROs e nitrogênio produzidos durante a inflamação podem danificar o DNA, proteínas e lipídios, resultando em lesões nas células e tecidos circundantes (MUNK *et al.*, 2018). Embora quantidades fisiológicas dessas espécies reativas possam ser toleradas em condições saudáveis, está claramente demonstrado que o estresse oxidativo prejudica a função neurológica em diversas condições, como doenças neurodegenerativas e infecciosas (TRIST *et al.*, 2019; PRINCIPI e ESPOSITO, 2020; BAI *et al.*, 2022).

Poucos estudos abordaram o estado de estresse oxidativo em pacientes com NCC. Rodríguez e colaboradores (2008) descobriram que pacientes com NCC apresentavam níveis mais elevados de peroxidação lipídica (LP) no líquido cefalorraquidiano em comparação com os controles, e esses níveis de LP estavam significativamente correlacionados com a resposta inflamatória e a gravidade dos sintomas. Curiosamente, mesmo os pacientes que receberam terapia com esteróides apresentaram níveis aumentados de LP. Prasad e colaboradores (2012) estudaram crianças com NCC e encontraram níveis mais elevados de MDA, proteína carbonilada e nitrito, acompanhados de baixos níveis de antioxidantes no líquido cefalorraquidiano (LCR). Além disso, foi relatado que, em diferentes doenças infecciosas, como infecções respiratórias agudas causadas por diversos vírus, o estresse oxidativo está implicado na lesão do tecido pulmonar e na disfunção da barreira epitelial, o que pode aumentar a suscetibilidade a novas infecções. O aumento do estresse oxidativo também pode promover fibrose tecidual e disfunção metabólica, como observado na hepatite viral (IVANOV *et al.*, 2017). Os resultados obtidos em nosso estudo devem ser considerados para otimizar o tratamento da NCC extraparenquimatosa e reduzir os danos colaterais associados.

No presente estudo, demonstramos a ocorrência de estresse oxidativo em um modelo murino de NCC extraparenquimatosa. As diferenças entre os animais infectados e

os de controle foram ainda mais pronunciadas nos níveis de proteína carbonilada. Além disso, observou-se que uma tentativa significativa de preservação dos cistos após a colheita do cérebro correlacionava com a intensidade do estresse oxidativo com a carga parasitária.

Em estudos anteriores, ratas apresentaram características inflamatórias mais acentuadas do que ratos (MOREIRA *et al.*, 2023; AMBROSIO *et al.*, 2015). No entanto, no presente estudo, encontramos concentrações maiores de MDA em machos. Uma possível explicação para essa relação pode ser a modulação do sistema de defesa antioxidante pelos hormônios; estrogênio e progesterona possuem propriedades antioxidantes (CHAINY e SAHOO, 2020). Por outro lado, as fêmeas parecem apresentar características inflamatórias mais intensas na NCC do que os machos (DEL BRUTTO *et al.*, 1988; FLEURY *et al.*, 2004). A interação entre cisticercose, hormônios sexuais e estresse oxidativo necessita de uma exploração mais aprofundada.

Em resumo, neste estudo, encontramos evidências significativas que indicam um aumento nos marcadores de estresse oxidativo na NCC extraparenquimatosa, o que reforça as semelhanças entre este modelo e a infecção humana. O monitoramento do estado de estresse oxidativo ao longo do curso da infecção poderia fornecer informações relevantes sobre o momento ideal para a administração de anti-helmínticos e corticosteróides, bem como para a retirada dos corticosteróides. No entanto, são necessários mais estudos experimentais para avaliar essa possibilidade a partir de uma perspectiva translacional.

Conclusão

Conclusão

- O modelo de NCC extraparenquimatosa experimental em ratos com a infecção por cistos de *T. crassiceps* em ratos elevou significativamente os níveis de MDA, tanto em ratos machos quanto em ratos fêmeas. E os níveis de carbonilação de proteínas foi significativamente maior em ratos machos.
- A infecção de *T. crassiceps* neste modelo de NCC produziu uma resposta inflamatória significativa com infiltrado na interface pia-aracnóide de ratos machos e fêmeas.

Referências

Referências

- ALLAN BUTTERFIELD, D. Amyloid β -peptide (1-42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A Review. *Free Radical Research*, v. 36, n. 12, p. 1307–1313, jan 2002.
- ALVAREZ, J. I. *et al.* Mesocystoides corti intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology*, v. 137, n. 3, p. 359–372, 29 jan. 2010.
- AYCICEK, A.; ISCAN, A. Oxidative and antioxidative capacity in children with cerebral palsy. *Brain Research Bulletin*, v. 69, n. 6, p. 666–668, mai 2006.
- BALU, M. *et al.* Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neuroscience*, v. 383, n.3, p. 295-300. 2005.
- BUSCH, C. J.; BINDER, C. J. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1862, n. 4, p. 398–406, abr. 2017.
- BUTALA, C. *et al.* Neurocysticercosis: current perspectives on diagnosis and management. *Frontiers In Veterinary Science*, [S.L.], v. 8, p. 1-10, 10 mai 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.615703>.
- MOREIRA, C. A. A. *et al.* Sexual dimorphism in the murine model of extraparenchymal neurocysticercosis. *Parasitology Research*, [S.L.], v. 122, n. 9, p. 2147-2154, 10 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-023-07913-4>.
- CASTRO, V. S. P. *et al.* Oxidative stress in rats experimentally infected by *Sporothrix schenckii*. *Microbial Pathogenesis*, v. 107, p. 1–5, 1 jun. 2017.
- CHOWIENCZYK, P. *et al.* Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with Type II diabetes. *Diabetologia*, v. 43, n. 8, p. 974–977, 9 ago. 2000.
- COYLE, C. M. *et al.* Neurocysticercosis: Neglected but Not Forgotten. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, p. e1500, 29 maio 2012.
- DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis. *Handbook of Clinical Neurology*, p. 1445–1459, 2014.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 15, n. 4, p. 316–328, ago. 2005.

DOMINIK STELZLE *et al.* Clinical characteristics and management of neurocysticercosis patients: a retrospective assessment of case reports from Europe. *Journal of Travel Medicine*, v. 30, n. 1, 12 out. 2022.

FÁTIMA, I. V. L. *et al.* Neuropsychiatric Manifestations of Neurocysticercosis: A Comprehensive Review. *Journal Of Drug And Alcohol Research*, [s. l], v. 12, n. 7, p. 1-10, 2023.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, mar. 1997.

FLEURY, A. *et al.* *Taenia solium*: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 8, p. e0003980–e0003980, 7 ago. 2015.

FOGAROLI, M. *et al.* Effect of Albendazole Treatment in an Experimental Model of Neurocysticercosis-Induced Hydrocephalus. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery*, [S.L.], v. 38, n. 01, p. 025-030, 21 fev. 2019. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0039-1678561>.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes*, v. 53, n. Supplement 1, p. S110–S118, 28 jan. 2004.

GRIPPER, L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Tropica*, v. 166, p. 218–224, fev. 2017.

GARCIA, J. L. *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. *European Journal of Nutrition*, v. 61, n. 2, p. 901–913, 12 out. 2021.

GRIPPER, L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Tropica*, v. 166, p. 218–224, fev. 2017.

HAGEN, T. M. *et al.* Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 26, p. 12808–12812, 20 dez. 1994.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, v. 355, n. 9210, Apr 1, p.1179-1180. 2000.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, v. 47, n. 3, p. 410–418, 18 ago. 2000.

HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*, v. 18, n. 9, p. 685–716, 2001.

HALLIWELL, B. Vitamin E and the treatment and prevention of diabetes: a case for a controlled clinical trial. *Singapore Medical Journal*, v. 43, n. 9, p. 479–484, 1 set. 2002.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231–255, mai 2004.

HAMAMOTO FILHO, P. T. *et al.* Development of an experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus. Pilot study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 30, p. 819–823, 1 dez. 2015.

HAMAMOTO FILHO, P. T. *et al.* *Taenia crassiceps* injection into the subarachnoid space of rats simulates radiological and morphological features of racemose neurocysticercosis. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, v. 33, n. 1, p. 119–123, 1 jan. 2017.

HAMAMOTO FILHO, P. T.; ZANINI, M. A.; FLEURY, A. Hydrocephalus in Neurocysticercosis: Challenges for Clinical Practice and Basic Research Perspectives. *World Neurosurgery*, v. 126, p. 264–271, jun. 2019.

HAMAMOTO FILHO, P. T. *et al.* Neurocysticercosis: a review into treatment options, indications, and their efficacy. *Research And Reports In Tropical Medicine*, [S.L.], v. 13, p. 67-79, dez. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/rrtm.s375650>.

HAMAMOTO FILHO, P. T. *et al.* Current Role of Surgery in the Treatment of Neurocysticercosis. *Pathogens* 2024, 13, 218. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030218>

JELINEK, M. *et al.* Oxidative Stress in the Brain: basic concepts and treatment strategies in stroke. *Antioxidants*, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1886, 25 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10121886>.

KHALIFA, R. M.; TEALE, J. M.; MOHAMADAIN, H. S. Studies on some metacestodes immunohistochemical response in mice as a model for human cysticercosis: II-TH1 type immune response in experimental Brain *taenia crassiceps* infected mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 42, n. 1, p. 183–190, 1 abr. 2012.

KIRAL, F. *et al.* Dogs with Hepatozoon canis respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Veterinary Parasitology*, v. 131, n. 1-2, p. 15–21, jul. 2005.

LIU, Q. *et al.* Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 24, n. 4-5, p. 305–313, ago. 2003.

MALLA, B. A. *et al.* An overview on Neurocysticercosis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 7, n. 6, p. 303–312, 2018.

MARCIN SIERRA, M. *et al.* Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, p. e0005646, 9 jun. 2017.

MARGOTTI, W. *et al.* Aging influences in the blood-brain barrier permeability and cerebral oxidative stress in sepsis. *Experimental Gerontology*, v. 140, p. 111063, out. 2020.

MARGOTTI, W. *et al.* Oxidative stress in multiple organs after sepsis in elderly rats. *Experimental Gerontology*, v. 160, p. 111705, abr. 2022.

MARTÍNEZ, I. *et al.* Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 211, p. 111797–111797, 1 mar. 2023.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Reprint of “Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death”. *Acta Tropica*, v. 165, p. 170–178, 1 jan. 2017.

MATOS-SILVA, H. *et al.* Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 70, p. 287–292, 1 abr. 2012.

MONTEIRO, S.; BLEGGI, F. Neurocysticercosis—Retrospective Study of Autopsy Reports, a 17-Year Experience. *Journal of Community Health*, v. 36, n. 5, p. 698–702, 18 mar. 2011.

OGAWA, N. Free radicals and neural cell damage *Rinsho Shinkeigaku*, 34 (1994), pp. 1266-1268.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Diretrizes da OMS para o manejo da neurocisticercose por “*Taenia solium*”. [s.l.] OPAS, 2022.

PARTHASARATHY, S. *et al.* Potential role of oxidized lipids and lipoproteins in antioxidant defense. *Free Radical Research*, v. 33, n. 3, p. 197–215, jan. 2000.

PAWLOWSKI, Z.; ALLAN, J.; SARTI, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 11-12, p. 1221–1232, out. 2005.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, n. 8416763, p. 1–13, 27 jul. 2017.

POHANKA, M. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia Microbiologica*, v. 58, n. 6, p. 503–513, 17 mar. 2013.

PRASAD, R. *et al.* Oxidative stress in Children with Neurocysticercosis. The Pediatric Infectious Disease Journal, p. 1, jul. 2012.

PU, X. *et al.* Oxidative stress and expression of inflammatory factors in lung tissue of acute mountain sickness rats. Molecular Medicine Reports, v. 25, n. 2, 9 dez. 2021.

RAY, G. *et al.* Evaluation of free radical status in CSF in childhood meningitis. Annals of Tropical Paediatrics, v. 20, n. 2, p. 115–120, 1 jun. 2000.

RODRÍGUEZ-RIVAS, R. *et al.* Neurocysticercosis in Latin America: Current epidemiological situation based on official statistics from four countries. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 16, n. 8, p. e0010652, 29 ago. 2022.

RODRIGUEZ, U. L. *et al.* Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1 out. 2008.

ROMÁN, G. *et al.* A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bulletin of the World Health Organization, v. 78, n. 3, p. 399–406, 2000.

SANTAMARÍA, E. *et al.* THE EXPERIMENTAL INFECTION OF PIGS WITH DIFFERENT NUMBERS OF TAENIA SOLIUM EGGS: immune response and efficiency of establishment. Journal Of Parasitology, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 69-73, fev. 2002. American Society of Parasitologists.
[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0069:teiopw\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0069:teiopw]2.0.co;2).

SANTIAGO SANTANA, J. M. *et al.* Oxidative stress and neuroinflammation in a rat model of co-morbid obesity and psychogenic stress. Behavioural Brain Research, v. 400, p. 112995, fev. 2021.

SCIUTTO, E. *et al.* Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. crassiceps cysticercosis. Parasite Immunology, v. 12, n. 6, p. 687–696, nov. 1990.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. Rev. Nutr, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.

SIBAT, H. F. Novel Aspects on Cysticercosis and Neurocysticercosis. [s.l.: s.n.].2013.

SINGH, A. K. *et al.* Immune responses to viable and degenerative metacestodes of Taenia solium in naturally infected swine. International Journal for Parasitology, v. 43, n. 14, p. 1101–1107, dez. 2013.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein Carbonylation. Antioxidants & Redox Signaling, v. 12, n. 3, p. 323–325, fev. 2010.

TSUKAHARA, H. *et al.* Oxidant and antioxidant activities in childhood meningitis. *Life Sciences*, v. 71, n. 23, p. 2797–2806, out. 2002.

ULBRICHT, A. S. S. F. *et al.* Effects of aerobic exercise training on oxidative stress in the skeletal muscles of obese rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 25, p. 404–408, 7 out. 2019.

VERÁSTEGUI, M. *et al.* Experimental infection model for *Taenia solium* cysticercosis in swine. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 1-2, p. 33–44, dez. 2000.

VERASTEGUI, M. *et al.* Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. v. 185, n. 8, p. 2259–2268, 1 ago. 2015.

VOS, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390 (2017), pp. 1211-1259

WHO. The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation. Report of a joint WHO/DFID-AHP Meeting, 20–21 September 2005, WHO Headquarters Geneva, with the participation of FAO and OIE, p. 62 Geneva, Switzerland: WHO 2006.

WILLMS, K.; ZURABYAN, R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, v. 137, n. 3, p. 335–346, 19 out. 2009.

WINKLER, A. S. *et al.* Epilepsy and neurocysticercosis in sub-Saharan Africa. *Wiener klinische Wochenschrift*, v. 121, n. S3, p. 3–12, out. 2009.

WINKLER, A. S., RICHTER H. Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries (LMIC) [Accessed Dec 28, 2023]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152896/1/WHO_HTM_NTD_NZD_2015.05_eng.pdf.

Artigo científico em inglês

Artigo científico em inglês

Oxidative stress in the murine model of extraparenchymal neurocysticercosis

Diego Generoso; Tatiane de Camargo Martins; Camila Renata Corrêa Camacho; Sabrina Setembre Batah; Alexandre Todorovic Fabro; Edda Sciutto; Agnès Fleury; Pedro Tadao Hamamoto Filho; Marco Antônio Zanini

Introduction

Neurocysticercosis (NCC) is a common parasitic disease of the central nervous system (CNS) in low- and middle-income countries. Despite recent decrease on its endemicity (especially in Latin America), NCC remains a relevant public health problem with significant social and economic burden in endemic countries.¹⁻³ NCC is also a health challenge in countries receiving immigrants from endemic regions, even though its extent and impact is not yet clear.^{4,5}

The disease has two different forms depending on the site at which the larvae of *Taenia solium* are found within the CNS: parenchymal (P-NCC) and extraparenchymal (EP-NCC). While P-NCC is highly responsive clinical treatment, with a relatively benign course (except by massive infection), EP-NCC is less responsive to anthelmintic drugs and more prone to complications, such as vasculitis, hydrocephalus, and raised intracranial pressure.⁶⁻⁸ Inflammation is a key pathophysiologic mechanism underlying such complications⁹, and oxidative stress has been shown to accompany the severity of NCC, mainly among patients with neurocysticercosis-induced hydrocephalus.¹⁰

The use of experimental models of NCC has allowed for a better comprehension of NCC's pathophysiology and they open pathways for testing new therapeutic regimens.¹¹⁻¹⁵ The experimental model of EP-NCC with *Taenia crassiceps* has been shown to closely resemble the features of human disease, with brain parenchyma displacement, hydrocephalus, and subarachnoid inflammation.^{16,17} In the present study, we investigated the presence of in situ oxidative stress markers in rats with EP-NCC.

Methods

We used Wistar rats (*Rattus norvegicus*) that were handled according to the ethical guidelines and current legislation for animal research. The project received approval from the local Institutional Review Board for ethics on animal use.

The animals were 6 weeks aged, they were kept under 12h light-dark cycles, with room temperature at 21°C, with free availability of water and conventional commercial food. In total, we used 50 animals (25 males and 25 females), with 10 animals (5 of each sex) as controls. The sample size was estimated considering a 30% of death following the inoculations, 66% of successful infection, reported data on oxidative stress in neurocysticercosis, type II error at 20%, and the level of significance at 5%.

Study design

Forty rats (20 males, 20 females) received a subarachnoid injection of 50 cysts of *T. crassiceps* and were maintained alive until 3 months post-inoculation. After the observational period, the animals were euthanized with thiopental overdose, and the brain was harvested after wide craniectomy. The presence of cysts in the subarachnoid space upon brain harvesting led to the inclusion of the animal; if no cysts were observed, the animal was discarded (not infected). The right hemisphere was embedded in 4% buffered paraformaldehyde, and the left hemisphere was frozen and stored at -80°C for posterior quantification of oxidative stress markers (malondialdehyde and protein carbonyl). Ten animals (5 males, 5 females) didn't receive any inoculation and underwent the same protocol for euthanasia and tissue processing at the same age as the inoculated animals.

Parasites and inoculations

Cysts of *T. crassiceps* (ORF strain) were maintained in the peritoneal cavity of mice (*Mus musculus*) and were aseptically removed onto Petri dishes with saline 0.9%. The cysts were selected based on their size (0.5mm) and membrane integrity. Each rat received 50 cysts in 0.2ml of saline 0.9%, as previously described.¹⁶ Briefly, after intraperitoneal anesthesia with a mixture of Xylazine and Ketamin, the skin was incised at the posterior cervical region along the cranio-cervical junction, and the subarachnoid space of the cisterna magna was punctured with a 24-gauge needle for the injection. Finally, the skin was sutured with 4.0 mononylon thread.

Histologic assessment

After 24 hours in 4% buffered paraformaldehyde for fixation, the right hemispheres were dehydrated in increasing concentrations of alcohol baths, clarified in xylene, and paraffinized. Slices were performed at the level of the optic chiasm with 5µm of thickness, and stained with hematoxylin and eosin.

The lymphocyte infiltrates in the basal arachnoid-pia-mater-brain interface were analyzed in a semi-quantitative fashion using the following score: 1 for absence of lymphocyte infiltration, 2 for discrete infiltration (scarce and sparse lymphocytes), 3 for moderate infiltration (focally present lymphocytes), and 4 for intense infiltration (several lymphocytes diffusely).

Oxidative stress assessment

Since the free radicals (reactive oxygen species) are rapidly degraded, they cannot be directly measured, instead, they activity can be measured indirectly by assessing their byproducts. Here, we assessed malondialdehyde and protein carbonil. Malondialdehyde is a derivate of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids¹⁸, and carbonil protein refers to the process by which the oxidation of side chains of aminoacids leads to the formation of reactive ketones and aldehydes.¹⁹

After defrosting the left hemispheres, they were homogenized. For malondialdehyde quantification, 250 µL of brain tissue supernatant was used and added to 750 µL of 10% trichloroacetic acid for protein precipitation. The samples were centrifuged (3000 rpm, for 5 minutes; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) and the supernatant removed. Thiobarbituric acid (ATB) was added in a proportion of 0.67% (1:1) and the samples were heated for 15 minutes at 100°C. After cooling, reading was performed at 535 nm on the Spectra Max 190 microplate reader (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). The MDA concentration was obtained by the molar extinction coefficient ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and the absorption of the samples and the final result reported in nmol/g of protein.

For protein carbonyl, 100µg of brain tissue was homogenized in ice-cold PBS solution (1mL, pH 7.4) using the ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA ® Werke Staufen/Germany, and centrifuged at 800g at 4°C for 10 min. The supernatant was incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) for 1 hour to derivatize the carbonyl

proteins. Soon after, the samples were deproteinized with trichloroacetic acid and centrifuged. The supernatant was discarded and the sediment was washed three times with an ethanol/ethyl acetate solution to remove excess DNPH, avoiding the quantification of chromophores not linked to the carbonyl protein. Finally, 6M guanidine hydrochloride was added to the washed sediment and then reading was performed at a wavelength of 370nm. Total protein concentrations in the samples were quantified using commercial tests to adjust carbonyl protein values. The concentrations of carbonyl proteins were expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein.

Statistical analysis

The analyses were performed in three steps. First, all infected animals (irrespective of the sex) were compared to the control group. For parametric data, we used the independent T-test and, for non-parametric data, the Mann-Whitney test. Next, the same tests were used for comparison of infected males with their controls, infected males with their controls, and infected females with their controls. Finally, we compared the infected male and female rats. The analyzes were performed with the softwares Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 24.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism v. 8.2.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) were used for the analyses. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

From the 20 male rats, seven died after inoculation and two did not have cysts, and from the 20 female rats, eight died and two did not develop infection. Therefore, we analyzed 11 male and 10 female infected rats.

On histologic assessment, we observed normal arachnoid-pia-mater-brain interface in the control animals, with a thin and delicate arachnoid layer juxtaposed to the pia-mater, with few detectable lymphocytes. Among the infected animals, we observed variable degrees of lymphocyte infiltration, with many cases of thickened arachnoid and lymphocytes in foci of infiltration or diffusely distributed (Figure 1). The median score of lymphocyte infiltration was higher for infected than control animals (3.0 vs 1.0, $p < 0.001$). The difference remained significant for the comparisons of males ($p = 0.038$) and females ($p = 0.003$). We found no significant differences between infected male and female rats ($p = 0.721$).

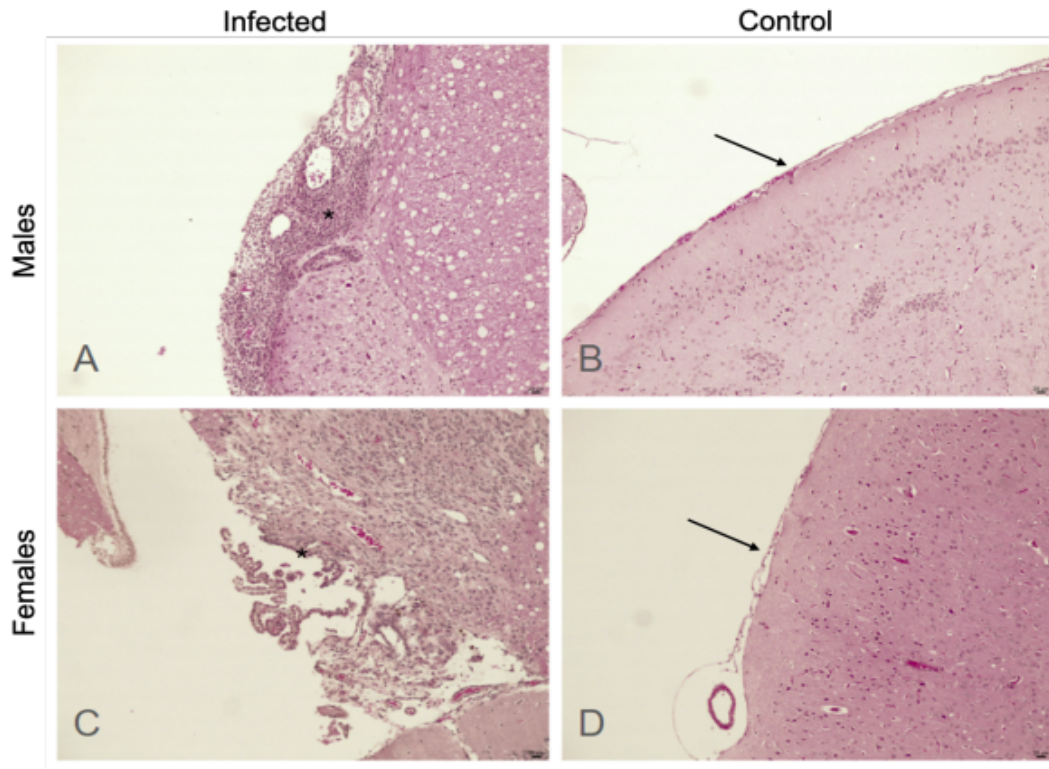


Figure 1. Microscopic view of the basal arachnoid-pia-mater-brain interfaces for males (A and B) and female (C and D) rats. On control animals, we can see a thin arachnoid layer (arrows) juxtaposed to the pia-mater with preserved histoarchitecture (B and D). On infected animals (A and C), the arachnoid is thickened lymphocytes (*) can be observed in intense (A) or discrete (C) infiltrations.

The mean malondialdehyde concentration was 15.6 ± 5.8 nmol/mg for infected animals, and 11.3 ± 3.2 nmol/g for control animals ($p = 0.048$). However, the difference was not significant when analyzing separately the males ($p = 0.059$) and the females ($p = 0.305$). Infected males had higher concentration of malondialdehyde than females ($p = 0.024$) (Figure 2).

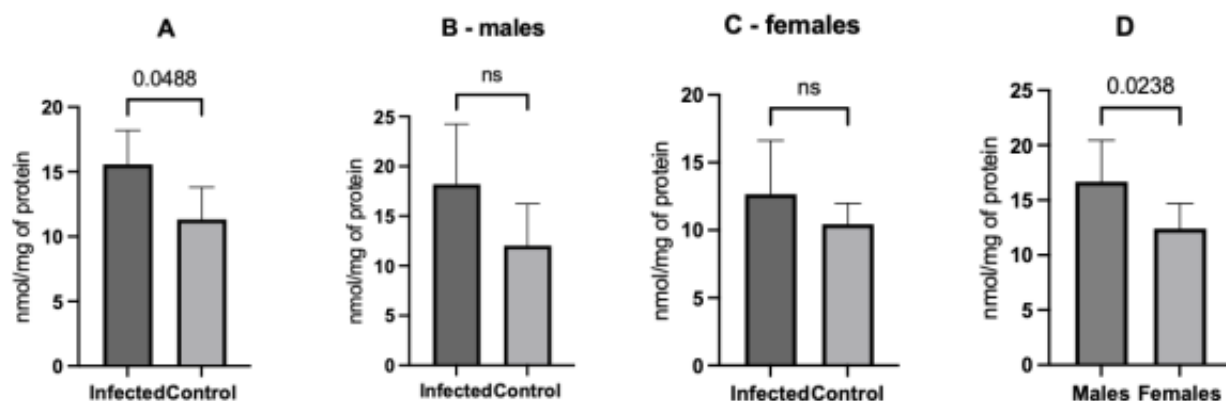


Figure 2. Comparisons of malondialdehyde concentration between the experimental groups. When considering all infected animals, the mean concentration was higher than the control animals (A). However, the differences were no longer significant (ns) when analyzing the male (B) and females (C) animals with their controls. Besides, considering the infected animals, males had higher concentration of malondialdehyde than females (D).

For protein carbonyl, except by the comparison between infected males and females ($p = 0.513$), all differences were significant. Infected animals had higher concentration than controls (789.2 ± 128.7 vs 582.5 ± 30.3 $\mu\text{g/g}$, $p < 0.001$), even when comparing only male ($p = 0.007$) and female rats ($p = 0.005$) (Figure 3).

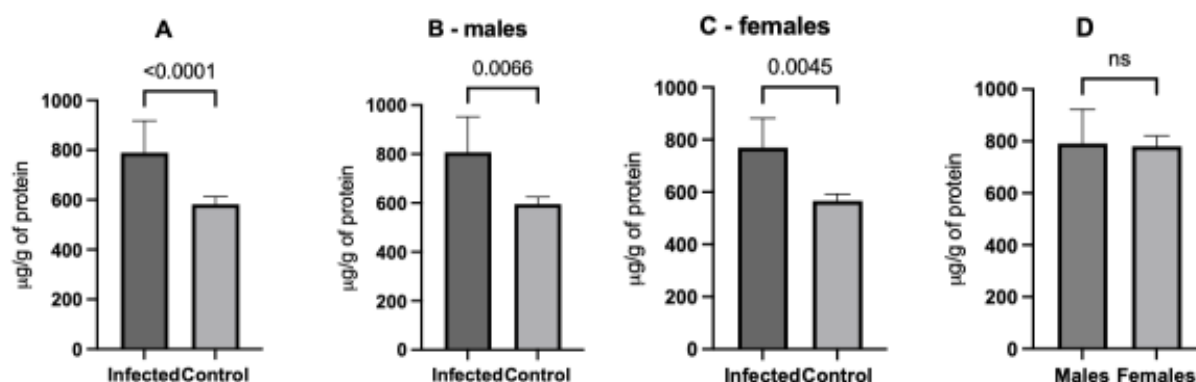


Figure 3. Comparisons of protein carbonyl between the experimental groups. The infected animals presented higher concentrations when comparing all animals (A), the males (B), and females (C) with their respective controls. There was no difference between infected males and females (D).

Discussion

Inflammation is present throughout the natural history of NCC, even in cases of calcified cysts.⁹ Inflammation is pivotal for the effective parasite destruction, however, it is a double-edge sword, because it is also related to the severity of the disease's symptoms. Since the use of anthelmintics may trigger inflammation by exposing the parasite's antigens to the immunological surveillance, the concomitant use of corticosteroids is necessary for symptom control.²⁰ Therefore, the control of inflammation while not impairing the cysticide's effectiveness is a research target.

Reactive oxygen and nitrogen species produced during inflammation may damage DNA, proteins, and lipids – with consequent lesions to surrounding cells and tissues.²¹ While a physiologic amount of these reactive species can be tolerated under healthy conditions, oxidative stress has been clearly demonstrated to impair neurological functions in several conditions such as neurodegenerative and infectious diseases.²²⁻²⁵

Few studies have addressed the status of oxidative stress in patients with NCC. Rodríguez et al. found that not only patients with NCC had higher levels of lipid peroxidase (LP) in the cerebrospinal fluid than controls, but also that the LP levels had a significant correlation with the inflammatory response and the severity of the symptoms.²⁶ Interestingly, even patient under steroid therapy had higher levels of LP. Prasad et al. studied children with NCC and found higher levels of malondialdehyde, protein carbonil, and nitrite accompanied by low levels of antioxidants in the CSF.²⁷

In the present study, we have demonstrated that oxidative stress is also present in the murine model of extraparenchymal neurocysticercosis. The differences between infected and control animals were more pronounced for protein carbonil – for which biomarker, even with smaller samples (i.e., using the subgroups by sex), the differences remained statistically significant.

In previous studies, female rats had higher inflammation features than male rats.^{28,29} On the opposite, in the present study we found higher concentration of malondialdehyde among males. A possible explanation is the relationship between hormones and the modulating antioxidant defense system: oestrogen and progesterone display antioxidant features.³⁰ However, the female sex is well recognized as more prone

to NCC susceptibility than the male sex. The crosstalk between cysticercosis, sexual hormones, and oxidative stress should be further explored.

Finally, despite the results of the present study were somehow expected, we provide one more feature demonstrating that the model of extraparenchymal neurocysticercosis with *T. crassiceps* resembles human infection. Monitoring the oxidative stress status throughout the course of the infection could give relevant information regarding the optimal time to administer anti-helminthics and corticoids, as well as for the withdrawal of the corticoids. Future experimental studies should evaluate this possibility aiming to a translational perspective.

References

1. Gripper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease-A review. *Acta Trop*. 2017;166:218-224.
2. Rodríguez-Rivas R, Flisser A, Norcia LF, Hamamoto Filho PT, Bonilla-Aldana DK, Rodríguez-Morales AJ, Carpio A, Romo ML, Fleury A. Neurocysticercosis in Latin America: Current epidemiological situation based on official statistics from four countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(8):e0010652.
3. Singh BB, Khatkar MS, Gill JP, Dhand NK. Estimation of the health and economic burden of neurocysticercosis in India. *Acta Trop*. 2017;165:161-169.
4. Serpa JA, White AC Jr. Neurocysticercosis in the United States. *Pathog Glob Health*. 2012;106(5):256-60.
5. Abraham A, Schmidt V, Kaminski M, Stelzle D, De Meijere R, Bustos J, Sahu PS, Garcia HH, Bobić B, Cretu C, Chiodini P, Deksne G, Dermauw V, Devleesschauwer B, Dorny P, Fonseca A, Gabriël S, Gómez-Morales MA, Kucsera I, Laranjo-González M, Trevisan C, Vilhena M, Walker NF, Zammarchi L, Winkler AS. Epidemiology and surveillance of human (neuro)cysticercosis in Europe: is enhanced surveillance required? *Trop Med Int Health*. 2020;25(5):566-578.
6. Marcin Sierra M, Arroyo M, Cadena Torres M, Ramírez Cruz N, García Hernández F, Taboada D, Galicia Martínez Á, Govezensky T, Sciutto E, Toledo A, Fleury A.

Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005646.

7. Hamamoto Filho PT, Zanini MA, Fleury A. Hydrocephalus in Neurocysticercosis: Challenges for Clinical Practice and Basic Research Perspectives. *World Neurosurg*. 2019;126:264-271.

8. Abanto J, Blanco D, Saavedra H, Gonzales I, Siu D, Pretell EJ, Bustos JA, Garcia HH; Cysticercosis Working Group in Peru. Mortality in Parenchymal and Subarachnoid Neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2021;105(1):176-180.

9. Hamamoto Filho PT, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A. Inflammation in neurocysticercosis: clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021;19(12):1503-1518.

10. Rodríguez U, Ríos C, Corona T, Talayero B, Ostrosky-Wegman P, Herrera LA. Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(10):1025-31.

11. Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology*. 2010;137(3):359-72.

12. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VB, Vinaud MC, Oliveira MA, Lino-Júnior Rde S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(4):287-92.

13. Fleury A, Trejo A, Cisneros H, García-Navarrete R, Villalobos N, Hernández M, Villeda Hernández J, Hernández B, Rosas G, Bobes RJ, de Aluja AS, Sciutto E, Fragoso G. *Taenia solium*: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003980.

14. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, Angulo N, Chile N, Carmen R, Medina R, García HH, Rodriguez S, Ortega Y, Gilman RH. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol*. 2015;185(8):2259-68.

15. Lange A, Mahanty S, Raimondo JV. Model systems for investigating disease processes in neurocysticercosis. *Parasitology*. 2019;146(5):553-562.

16. Hamamoto Filho PT, Fogaroli MO, Oliveira MAC, Oliveira CC, Batah SS, Fabro AT, Vulcano LC, Bazan R, Zanini MA. A Rat Model of Neurocysticercosis-Induced Hydrocephalus: Chronic Progressive Hydrocephalus with Mild Clinical Impairment. *World Neurosurg.* 2019;132:e535-e544.
17. Espinosa-Cerón A, Méndez A, Hernández-Aceves J, Juárez-González JC, Villalobos N, Hernández M, Díaz G, Soto P, Concha L, Pérez-Osorio IN, Ortiz-Retana JJ, Bobes RJ, Parkhouse RM, Hamamoto Filho PT, Fragoso G, Sciutto E. Standardizing an Experimental Murine Model of Extraparenchymal Neurocysticercosis That Immunologically Resembles Human Infection. *Brain Sci.* 2023;13(7):1021.
18. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(4):316-28.
19. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(3):323-5.
20. Toledo A, Osorio R, Matus C, Martinez Lopez Y, Ramirez Cruz N, Sciutto E, Fragoso G, Arauz A, Carrillo-Mezo R, Fleury A. Human Extraparenchymal Neurocysticercosis: The Control of Inflammation Favors the Host...but Also the Parasite. *Front Immunol.* 2018;9:2652.
21. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:33-50.
22. Munk M, Poulsen FR, Larsen L, Nordström CH, Nielsen TH. Cerebral Metabolic Changes Related to Oxidative Metabolism in a Model of Bacterial Meningitis Induced by Lipopolysaccharide. *Neurocrit Care.* 2018;29(3):496-503.
23. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019;18(6):e13031.
24. Principi N, Esposito S. Bacterial meningitis: new treatment options to reduce the risk of brain damage. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(1):97-105.
25. Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2022;77:101619.

26. Rodríguez U, Ríos C, Corona T, Talayero B, Ostrosky-Wegman P, Herrera LA. Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(10):1025-31.

27. Prasad R, Anil, Mishra OP, Mishra SP, Upadhyay RS, Singh TB. Oxidative stress in children with neurocysticercosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(10):1012-5.

28. Moreira CAA, Murayama LHVM, Martins TC, Oliveira VT, Generoso D, Machado VMV, Batah SS, Fabro AT, Bazan R, Zanini MA, Sciutto E, Fleury A, Hamamoto Filho PT. Sexual dimorphism in the murine model of extraparenchymal neurocysticercosis. *Parasitology Res* 2023;122(9):2147-2154.

29. Ambrosio JR, Valverde-Islas L, Nava-Castro KE, Palacios-Arreola MI, Ostoa-Saloma P, Reynoso-Ducoing O, Escobedo G, Ruíz-Rosado A, Dominguez-Ramírez L, Morales-Montor J. Androgens exert a cysticidal effect upon *Taenia crassiceps* by disrupting flame cell morphology and function. *PLoS One* 2015;10(6):e0127928.

30. Chainy GBN, Sahoo DK. Hormones and oxidative stress: an overview. *Free Radical Research.* 2019;54(1):1-26.

Comprovante de aprovação do projeto científico no CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



CERTIFICADO Nº 1330/2019 – CEUA

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

Certificamos que o projeto intitulado: "Análise das metaloproteínas – 2 e 9 em modelo experimental neurocisticorse." – Pesquisador: Diego Generoso

– Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zanin – Coorientador: Prof. Dr. Pedro Tadeo Hamamoto Filho – Colaboradores: Profa. Ass. Vânia Maria de Vasconcelos e Tatiane de Camargo Martins, registrada com o nº 1330/2019, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em Reunião Extraordinária de 29 de janeiro de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/01/2023
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Wistar
Nº de animais	30
Idade/Peso	5 semanas – 100 à 150 Gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central


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


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

Distrito Rubião Junior, s/nº – Botucatu – SP – CEP: 16.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail: ceua@fmb.unesp.br



unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CERTIFICADO RETIFICADO Nº 1330/2019 – CEUA

Criado pela Portaria DFM nº 811 de 13/12/2012

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto intitulado: **"Análise das metaloproteínas - 2 e 9 em modelo experimental de neurodegeneração"** - conduzido pelo pesquisador: **Diego Generoso** - Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zanini - **Coordenador**: Prof. Dr. Pedro Tadeu Hamamoto Filho, registrado com o nº **1330/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, sítio Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, de Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 28 de junho de 2022.

Obs.: Certificado retificado devido a inclusão de mais 01 Grupo Experimental com Acréscimo de 25 animais.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	31/01/2023
Especie/Linhagem/Raça	WISTARS
Nº Total de animais	25
Idade/Peso	05 Semanas - 100 a 150 Gramas
Sexo	Fêmeas

Prof. Dra. Alessandra Berna Furlan Poligato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

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

The research project registered by the number 1330/2019 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School - São Paulo State University (UNESP) on 28/June/2022.

Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - SP, CEP: 13618-970 Fones: (14) 3880.1880 - E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br/sara.sampaio@unesp.br



Ofício nº 006/2024 – CEUA – FMB/UNESP

Botucatu, 27 de março de 2024.

Ilmo.

Prof. Dr. Marco Antonio Zanini

Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria – UNESP

Prezado Professor,

Em atendimento ao documento enviado em 28 de novembro de 2023, solicitando a inclusão de novos testes e também alteração de título referente ao Projeto de Pesquisa **“Análise das metaloproteínas – 2 e – 9 em modelo experimental de neurocisticercose.” (Protocolo CEUA 1330/2019)**, a solicitação foi **APROVADA**. Reiteramos que a aprovação da solicitação pela CEUA não prevê a inclusão de nenhum animal adicional aos já solicitados no projeto de pesquisa **1330/2019**.

Título Anterior: “Análise das metaloproteínas – 2 e – 9 em modelo experimental de neurocisticercose.”

Título Atual: “Estresse oxidativo no modelo experimental de neurocisticercose extraparenquimatosa.”

Atenciosamente,

Profa. Dra. Débora C. Damasceno

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Faculdade de Medicina de Botucatu – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/nº

Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) – Bloco V – Botucatu – S/P – CEP: 18618-970

Telefone: (14) 3880-1880 – Voip e WhatsApp

E-mail: ceua.fmb@unesp.br ou sara.sampaio@unesp.br / **Site:** www.fmb.unesp.br

