



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

Aderaldo Costa Alves Junior

Alterações de líquido e imunofenotipagem linfocítica
em modelos experimentais 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 Antônio Zanini
Coorientador: Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho

Botucatu – SP
2021

Aderaldo Costa Alves Junior

Alterações de líquido e imunofenotipagem linfocítica
em modelos experimentais de Neurocisticercose
Extraparenquimatosa

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zanini
Coorientador: Dr. Pedro Tadao Hamamoto Filho

Botucatu – SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alves Junior, Aderaldo Costa.

Alterações de líquido e imunofenotipagem linfocítica em
modelos experimentais de neurocisticercose
extraparenquimatosa / Aderaldo Costa Alves Junior. -
Botucatu, 2021

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

Orientador: Março Antonio Zanini

Coorientador: Pedro Tadao Hamamoto Filho

Capes: 40102084

1. Taenia. 2. Cisticercose. 3. Neurocisticercose.
4. Imunofenotipagem. 5. Líquido cefalorraquidiano.

Palavras-chave: Estudos experimentais; Neurocisticercose;
Taenia.

Agradecimentos

Agradeço a todos os mestres que incitaram em mim o interesse pela pesquisa científica no decorrer da minha vida acadêmica, em especial ao primeiro e mais catedrático deles, Prof. Dr. Almir Ferreira de Andrade, a quem devo minha base na carreira neurocirúrgica, assim como ao meu orientador Prof. Marco Antônio Zanini e meu coorientador Dr. Pedro Hamamoto Filho, pela confiança na minha capacidade em realizar esse projeto e pelos ensinamentos durante o meu treinamento enquanto residente. Não posso deixar também de mencionar outros grandes mentores que tanto me ensinaram: Dr. Rodrigo Bazan, Dr. Gustavo Patriota, Dr. Carlos Clayton.

Sem dúvidas não seria possível sequer sonhar com quaisquer conquistas sem o apoio incondicional da minha família: meus pais, Aderaldo e Aurilene, aos quais devo tudo o que sou, minhas irmãs Elayne, Lisi e Karol, minhas eternas inspirações de vida, e meu esposo Michael, companheiro e maior incentivador em minhas ambições pessoais e profissionais.

Este trabalho não seria viável sem o apoio indispensável de tantos pesquisadores que contribuíram durante sua realização: primeiramente na Unidade de Pesquisa Experimental da Unesp, que aqui agradeço à Profa. Patrícia Pintor, Profa. Camila Renata e Diego Generoso, bem como aos responsáveis por diversos laboratórios dessa unidade: Imunoistoquímica, Histotecnologia, ELISA e biotério. Agradeço ao Prof. José Eduardo Corrente, pela contribuição com a análise estatística. Ressalto também o apoio da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – câmpus de Botucatu, em especial à Profa. Regina Takahira e suas residentes do Laboratório Clínico Veterinário, e à Profa. Vania Machado e servidores do Serviço de Diagnóstico por Imagem. Por fim, mas não menos importantes, agradeço às Profas. Luciane Melício e Daniela Santos pela contribuição na análise histopatológica, e o imenso esforço dos alunos Tatiane Camargo e Miguel Ossuna.

Resumo

A Neurocisticercose (NCC) é uma doença de grande prevalência mundial, levando a um alto impacto social e na saúde pública. A forma extraparenquimatosa da doença ocorre quando o cisticerco está presente no espaço subaracnóideo dos pacientes, provocando uma reação inflamatória no líquido (LCR) que cursa com grave sintomatologia e altas taxas de morbimortalidade. Modelos experimentais de NCC têm grande importância por permitir o melhor entendimento da doença e assim otimizar a terapêutica. Objetivamos neste estudo analisar as alterações no líquido e sistema nervoso central (SNC) de animais infectados com *Taenia crassiceps* em seus espaços subaracnoideos, bem como caracterizar as linhagens linfocitárias envolvidas na resposta inflamatória cerebral. Na primeira parte do estudo, 39 coelhos foram submetidos à inoculação de cistos (grupo 1, $n_{\text{inicial}}=20$, $n_{\text{final}}=13$) ou antígenos (grupo 2, $n_{\text{inicial}}=19$, $n_{\text{final}}=12$) de *T. crassiceps* por meio de punção das cisternas magnas, sendo observados por 6 meses com coletas periódicas de LCR para análise laboratorial, imagens de ressonância magnética (RM) e remoção encefálica para análise histopatológica. Os coelhos apresentaram aumento de celularidade e proteinorraquia no líquido com pico em duas semanas e recuperação em até três meses, sendo mais significativos no grupo 1 (cistos), além de modificação no padrão celular liquórico para um predomínio linfocitário persistente. Houve também aumento nos volumes ventriculares (hidrocefalia presente em 64,3% dos animais do grupo 1 e 55,6% do grupo 2) e na cisterna quadrigeminal (alargamento cisternal presente em 92,9% dos animais do grupo 1 e 66,7% do grupo 2) nas imagens de RM, enquanto que a análise histopatológica evidenciou padrão de meningite linfocitária discreta na maioria das lâminas de ambos os grupos e uma densidade de neurônios inferior no grupo inoculado com cistos (grupo 1) em relação ao grupo 2 (antígenos). O modelo experimental mostrou-se viável e prático em coelhos, reproduzindo as alterações observadas na NCC humana. Já na segunda parte do projeto, a

imunofenotipagem do tecido cerebral para determinação do padrão linfocitário foi realizada em 19 ratos expostos a cistos de *T. crassiceps* em seus espaços subaracnoideos por: 1 mês (grupo 1_R, n=4), 4 meses (grupo 2_R, n=11) ou 6 meses (grupo 3_R, n=4). Foi encontrada expressão para os marcadores linfocitários CD19, CD56, CD8 e CD4, sendo o último em uma apresentação bimodal com picos no 1º e 6º meses após as inoculações, e o CD8 com maior expressão após 6 meses de observação.

Abstract

Neurocysticercosis (NCC) is a highly prevalent disease worldwide, leading to an important social and public health impact. The extraparenchymal form occurs when the cysticercus is located in the subarachnoid space, causing an inflammatory reaction to the cerebrospinal fluid (CSF) that evolves with severe symptoms and high rates of morbidity and mortality. Experimental models of NCC are crucial for allowing a better understanding of the disease and thus optimizing therapy. The aim of this study was to analyze changes in the CSF and central nervous system (CNS) of animals infected with *Taenia crassiceps* in their subarachnoid spaces, as well as to characterize the lymphocyte strains involved in the CNS inflammatory response. In the first part of this study, 39 rabbits were inoculated with cysts (group 1, $n_i=20$, $n=13$), or antigens (group 2, $n_i=19$, $n=12$) of *T. crassiceps* through punctures to the cisterna magna, followed by observation for 6 months with periodic CSF samples collection for laboratory analysis, magnetic resonance imaging (MRI) and finally brain removal for histopathological analysis. These animals showed increased cellularity and protein concentration in CSF with a peak in two weeks and normalization in up to three months, more significant in the group 1 (cysts), in addition to changes in CSF cell pattern for a persistent lymphocyte predominance. There was also an increase in ventricular (60.9% of animals) and quadrigeminal cistern (82.6%) volumes in both groups on MRI, while histopathology showed a mild lymphocytic meningitis on most of the cuts in both groups and an inferior density of neurons on group 1 compared to group 2. This experimental model proved to be viable in rabbits, reproducing the changes observed in human NCC. In the second part of this project, immunophenotyping of brain tissue to determine the lymphocyte pattern was performed in 19 rats exposed to cysts of *T. crassiceps* in their subarachnoid spaces for: 1 month (group 1_R, $n=4$), 4 months (group 2_R, $n=11$) or 6 months (group 3_R, $n=4$). We found expression to the lymphocytic markers CD19, CD56, CD8 and CD4, the latter with a bimodal fashion with peaks in the

first and sixth months after the inoculations, and CD8 presenting higher expression after six months of observational period.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Coelho alocado em sua gaiola individual.

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

Figura 3: Fotografia ilustrando punção suboccipital à cisterna magna de coelho com saída espontânea de líquido.

Figura 4: Cateterização do arco aórtico em coelhos.

Figura 5: Delineamento do estudo em coelhos.

Figura 6: Delineamento do estudo em ratos.

Figura 7: Estudo radiológico encefálico dos coelhos.

Figura 8: Aspecto encefálico dos coelhos imediatamente após a remoção.

Figura 9: Infiltrados periventriculares e perivasculares em lâminas de encéfalos de coelhos.

Figura 10: Gráficos referentes às comparações entre os dois grupos quanto às densidades celulares quantificadas na análise histopatológica.

Figura 11: Cortes histológicos de encéfalos de coelhos corados por HE.

Figura 12: Análise imunoistoquímica dos marcadores linfocitários em tecido cerebral de ratos.

Gráfico 1. Gráfico ilustrativo das variações de número médio de células por μL de LCR dos coelhos durante o período de observação.

Gráfico 2. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de linfócitos na contagem diferencial celular do LCR dos coelhos durante o período de observação.

Gráfico 3. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de outras células mononucleares não linfócitos na contagem diferencial celular do LCR dos coelhos durante o período de observação.

Gráfico 4. Gráfico ilustrativo das variações de proteinorraquia média no LCR dos coelhos durante o período de observação.

Gráfico 5. Gráfico ilustrativo das variações médias de carbonilas nas amostras de LCR de coelhos, por grupos.

Gráfico 6: Expressão imunoistoquímica dos marcadores linfocitários CD4, CD8, CD19 e CD56.

Anexo I. Gráficos ilustrativos das medianas e amplitudes de hemácias por μL de líquido durante o período de observação, indicativos de acidentes de punção.

Anexo II. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de heterófilos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação.

Anexo III. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de eosinófilos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação.

Anexo IV. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de macrófagos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação.

Lista de tabelas

Tabela 1. Correlação de Spearman entre os parâmetros de celularidade e proteínas no líquido durante o período de observação, por grupos.

Tabela 2: Volumes ventriculares e cisternais mensurados e suas interpretações qualitativas ao final do período de observação, por grupos.

Tabela 3: Correlação de Spearman entre os volumes ventriculares e cisternais e os parâmetros de celularidade e proteínas no líquido nos dois primeiros meses de observação, por grupos.

Lista de abreviaturas e siglas

AQP4: aquaporina 4

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

IHQ: Imunoistoquímica

LCR: líquido cefalorraquidiano (líquido cefalorraquidiano)

M. corti: *Mesocostoides corti*

M. musculus: *Mus musculus*

n: tamanho amostral

NK: *natural killers*

NCC: Neurocisticercose

SF: Soro fisiológico

SNC: Sistema Nervoso Central

T0: tempo inicial

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. solium: *Taenia solium*

Th: (linfócito) T *helper*

Unipex: Unidade de Pesquisa Experimental

UNESP: Universidade Estadual Paulista

vs.: *versus*

Lista de símbolos

': minuto

°C: grau Celsius

%: porcentagem

±: mais ou menos

μL: microlitro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

G: Gauge

kg: quilograma

M: molar

m²: metro quadrado

min: minuto

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

mm: milímetro

mm³: milímetro cúbico

ms: milissegundo

nm: nanômetro

nmol: nanomol

T: Tesla

Sumário

1. Introdução
 - 1.1. Neurocisticercose
 - 1.2. Líquor e Neurocisticercose
 - 1.3. Processo inflamatório – aspectos fisiológicos e patogênicos da Neurocisticercose
 - 1.4. Modelos experimentais em Neurocisticercose
2. Justificativa
3. Objetivos
4. Materiais e Métodos
 - 4.1. Parte I – coelhos
 - 4.1.1. Animais
 - 4.1.2. Parasitas e inoculações
 - 4.1.3. Delineamento experimental
 - 4.1.4. Cálculo do tamanho amostral
 - 4.1.5. Análise do líquido
 - 4.1.6. Análise radiológica
 - 4.1.7. Análise anatomopatológica
 - 4.1.8. Análise estatística
 - 4.2. Parte II – ratos
 - 4.2.1. Animais
 - 4.2.2. Parasitas e inoculações
 - 4.2.3. Delineamento experimental
 - 4.2.4. Análise imunoistoquímica
 - 4.2.5. Análise estatística
5. Resultados
 - 5.1. Parte I – coelhos
 - 5.1.1. Alterações líquóricas
 - 5.1.1.1. Bioquímica e celularidade

- 5.1.1.2. Estresse Oxidativo
 - 5.1.2. Alterações radiológicas
 - 5.1.3. Alterações anatomopatológicas
- 5.2. Parte II – ratos
 - 5.2.1. Alterações imunoistoquímicas
- 6. Discussão
- 7. Conclusões
- 8. Referências
- 9. Artigo Científico em Inglês
- 10. Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA
- 11. Anexos
 - Anexo I – Hemácias
 - Anexo II – Heterófilos
 - Anexo III – Eosinófilos
 - Anexo IV – Macrófagos

1. Introdução

A Neurocisticercose (NCC) é considerada um problema da saúde pública em diversos países em desenvolvimento nos quais condições sociais, econômicas e culturais favorecem a manutenção desta zoonose de modo endêmico, sendo também descrita como a infecção parasitária mais comum do sistema nervoso central (SNC).^{1,2} A doença desenvolve-se em seres humanos quando ocorre uma inversão no ciclo de vida habitual da *Taenia solium*. O porco normalmente é o hospedeiro intermediário do ciclo, portando o verme no seu estágio larval (cisticerco) alojado em seus tecidos moles, enquanto o homem é o hospedeiro definitivo e apresenta a doença denominada teníase, na qual o verme desenvolve sua forma adulta no intestino humano após a ingestão de cisticercos provenientes da carne de porcos infectados. Já na forma de transmissão da NCC, o homem passa a ser então hospedeiro intermediário após ingerir ovos da tênia em água ou alimentos contaminados, que se desenvolvem em cisticercos e se alojam em seu SNC.^{3,4,5}

A *T. solium* é um platelminto pertencente à classe Cestoda, por este motivo também chamado cestóide ou cestódeo, e seu estágio larval é denominado cisticerco, também conhecido por *Cysticercus cellulosae* (nomenclatura sem valor taxonômico), que se instala preferencialmente no SNC humano. Morfologicamente, o cisticerco apresenta uma membrana repleta de conteúdo vesicular líquido translúcido e o *receptaculum capitis*, que contém o escólex invaginado da futura tênia, estrutura composta por quatro ventosas e duas fileiras de acúleos, responsáveis pela fixação da forma adulta do verme no intestino humano.³

O estabelecimento do verme no SNC humano tem potencial de provocar as manifestações neurológicas descritas da NCC tanto pela resposta inflamatória do hospedeiro, quanto pela própria presença física do parasita, levando a um desequilíbrio homeostático local ou sistêmico. Muitas pessoas, entretanto, podem apresentar pouca sintomatologia relacionada à infecção,

sendo diversos fatores associados ao desenvolvimento de manifestações clínicas. A forma parenquimatosa da doença, por exemplo, que ocorre quando o parasita se encontra no parênquima encefálico, pode permanecer assintomática por longos períodos, manifestando-se em fases tardias mais frequentemente com crises epiléticas em decorrência da lesão cicatricial no tecido encefálico. Por outro lado, a forma extraparenquimatosa, mais agressiva e sintomática, cursa com manifestações clínicas em 15-54% dos casos: o parasita alcança os sistemas ventriculares e cisternas subaracnoideas, levando a um quadro de hidrocefalia secundária à obstrução mecânica do fluxo liquórico e à resposta inflamatória induzida pela sua presença.^{6,7} Como consequência, ocorre, além do acúmulo de líquido cefalorraquiano (LCR), espondilite, aracnoidite basal, edema periventricular e ventriculite, podendo ser necessárias cirurgias para retirada do parasita ou implante e revisões de derivações, elevando assim as taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes.^{6,8}

Finalmente, em decorrência das alterações inflamatórias no espaço subaracnoideo, a NCC induz a modificações na composição do líquido do hospedeiro, alterando desta forma seus parâmetros laboratoriais e configurando a síndrome liquórica da cisticercose encéfalo-meníngea. Este conceito foi classicamente introduzido por Lange em 1940,⁹ consistindo basicamente no aumento da contagem celular com predomínio linfomononuclear, presença de eosinofilia e positividade da reação de fixação do complemento para cisticercose.^{10,11}

1.1. Neurocisticercose

A NCC é uma doença de grande prevalência mundial, sendo endêmica em determinados países em desenvolvimento e com alto impacto social e na saúde pública, especialmente na América Latina, África e Ásia. A Organização Mundial da Saúde estima que 50 milhões de indivíduos estejam infectados pelo complexo teníase-cisticercose e, por ano, 50 mil mortes sejam contabilizadas em decorrência da doença.¹² Além disso, esta é a principal causa prevenível de

epilepsia secundária em todo o mundo: cerca de 5 milhões de pessoas são epiléticas devido à NCC. Na América Latina e no Caribe, estima-se que 75 milhões de pessoas vivam sob risco de infecção, sendo que 0,45–1,35 milhão de pessoas apresentam quadro de epilepsia atribuída à NCC.¹³

Esta é considerada uma doença negligenciada, uma vez que trata-se de uma zoonose potencialmente erradicável devido às seguintes razões: (1) a forma adulta da *T. solium* vive exclusivamente em humanos; (2) a teníase é a única fonte de infecção para o hospedeiro intermediário; (3) a cisticercose suína pode ser controlada; (4) não existem reservatórios selvagens; e (5) existem cisticidas seguros e potentes contra o verme e o cisticerco.¹ No Brasil, esta condição é endêmica com tendência de queda particularmente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, entretanto, estes dados oficiais levam à discussão entre pesquisadores se há ou não viés em decorrência da possível subnotificação nas demais regiões do país, evidenciada por recente aumento na notificação de casos na região Nordeste.¹⁴ Estudos de autópsia revelam uma frequência estimada de 0,12–9%, e em estudos clínicos os valores variam de 0,03–13,4% no Brasil.¹⁵ Publicações mais recentes, por outro lado, demonstram uma tendência de queda nos índices de mortalidade secundários à NCC no Brasil nos últimos anos, com uma taxa média de 0,82 mortes a cada 1 milhão de habitantes.¹³

Mesmo diante da queda geral da prevalência e mortalidade em decorrência da doença, o estudo da NCC ainda é relevante, considerando-se: a alta morbidade e oneração dos recursos de saúde pública destinados ao tratamento desta condição, ao fato de ainda não ter sido possível obter a erradicação da doença no mundo mesmo existindo tratamento e conhecendo-se o ciclo de vida do parasita, e à recente reemergência em países considerados desenvolvidos atribuída à importação de casos por imigrantes.⁴ Estes fatores justificam o interesse científico da NCC, de modo a compreender melhor os mecanismos envolvidos na patogênese da doença, objetivando assim otimizar as estratégias terapêuticas e preventivas.

A apresentação clínica da NCC é heterogênea, podendo manifestar-se mais frequentemente com crises epiléticas, seguido por síndrome de hipertensão intracraniana, meningite, cefaleia sem evidência de aumento da pressão intracraniana ou meningite, e síndrome medular. O quadro clínico depende de diversos fatores, que podem estar relacionados ao indivíduo infectado (idade, sexo, padrão genético) ou ao parasita (número, estágio, localização).⁸ A topografia na qual se encontra o cisticerco também permite classificar a doença em duas formas principais: parenquimatosa, quando o parasita encontra-se alojado dentro no tecido encefálico, sendo esta a forma mais comum e cuja sintomatologia mais frequente é a epilepsia, e a forma extraparenquimatosa, na qual o cisticerco encontra-se nos compartimentos líquidos (espaço subaracnoideo, ventrículos e cisternas), e leva a um quadro mais grave, evoluindo mais comumente com hidrocefalia e síndrome de hipertensão craniana (até 72%) e com altas taxas de morbimortalidade.⁸ A etiologia da hidrocefalia na NCC é classicamente atribuída à obstrução mecânica provocada pela presença do cisticerco nos sistemas ventriculares. Estudos mais recentes, entretanto, vêm demonstrando o papel dos efeitos inflamatórios provocados pelo parasita no SNC, sugerindo uma etiologia mista para a hidrocefalia.^{7,16,17}

O tratamento da NCC tem como princípios a eliminação do parasita e o manejo das complicações decorrentes da presença do cisticerco no SNC. O uso de antiparasitários na NCC foi inicialmente descrito em 1979, tendo sido o praziquantel a droga de escolha.¹⁸ Atualmente, o tratamento estabelecido inclui a administração de albendazol ou praziquantel como fármacos cisticidas associados a corticosteroides (em especial dexametasona ou prednisona), de modo a prevenir as complicações decorrentes de uma exacerbação da resposta inflamatória provocada pelo próprio parasita ou pela sua destruição. Embora o tratamento farmacológico ainda seja motivo de discussão na literatura, o que se observa na prática clínica é uma indicação mais precisa para casos com cistos parenquimatosos ainda vivos ou em degeneração, porém, uma eficácia

questionável na NCC extraparenquimatosa. Vale ressaltar que o que se estipula é um esquema terapêutico personalizado, devendo-se incrementar as doses de anti-inflamatórios nos pacientes com apresentação clínica mais exuberante em decorrência de um padrão inflamatório mais intenso, assim como utilizar esquemas mais brandos de corticosteroides para casos menos graves em sintomatologia, de modo a preservar a eficácia das drogas antiparasitárias.^{17,19}

O tratamento neurocirúrgico também possui papel fundamental no manejo da NCC. Por um lado, a evolução para hidrocefalia pode requer o desvio liquórico para alívio da consequente hipertensão intracraniana, classicamente realizado por meio do implante de cateteres de derivação ventricular para drenar líquido para outros compartimentos do corpo, sendo a cavidade peritoneal o mais comum. Derivações ventrículo-peritoneais, entretanto, estão associadas a altas taxas de complicações que incluem ventriculite, meningite e obstrução do cateter por cistos, podendo chegar a uma taxa de reoperação em até 82% dos casos.^{20,21} Mais recentemente, procedimentos endoscópicos minimamente invasivos tornaram viável a comunicação dos sistemas ventriculares às cisternas basais do crânio em uma técnica conhecida como terceiro-ventriculostomia, evitando-se assim a dependência de dispositivos que funcionam como corpos estranhos. Além disso, o neurocirurgião também pode atuar na própria remoção cirúrgica de cisticercos, em especial em casos nos quais a hidrocefalia é decorrente da obstrução mecânica ao fluxo de líquido pelos cistos, seja por via endoscópica ou aberta (craniotomia). Cistos em fase de degeneração, entretanto, tornam-se altamente aderidos ao tecido nervoso, o que aumenta os riscos de um eventual procedimento cirúrgico para remoção dos mesmos, tanto pela chance de lesão a tecidos viáveis, quanto pela acentuada resposta inflamatória no epêndima e estruturas vasculares encefálicas.²²

1.2. Líquor e Neurocisticercose

O líquido cefalorraquidiano, também conhecido como líquido cefalorraquidiano ou líquido, consiste na maior parte do fluido extracelular do SNC, e funciona como um meio fisiológico para o encéfalo, além de fornecer ao mesmo proteção mecânica e reduzir seu peso efetivo: no ar, o encéfalo pesa cerca de 1.500g, enquanto que imerso no líquido seu peso cai para 49,5g, de acordo com a lei de Arquimedes.²³ A anatomia do sistema liquórico inclui os ventrículos cerebrais, espaços subaracnoideos encefálicos e espinais, cisternas e sulcos. Tradicionalmente, descreve-se a fisiologia do líquido com uma produção e secreção majoritariamente nos plexos coriáceos intraventriculares (80%), em uma taxa de 0,3–0,4mL/min, com um volume total de 90 a 150mL em adultos, circulando unidirecionalmente pelas cavidades ventriculares e espaço subaracnoideo até ser absorvido nas vilosidades aracnoideas localizadas nos seios venosos.²⁴

Este modelo clássico da fisiologia da circulação liquórica tem sido questionado na literatura recente por diversos autores que demonstraram a importância da participação de outros mecanismos.^{24–29} Quanto à produção de líquido, o papel do endotélio dos capilares cerebrais vem sendo ressaltado nos últimos anos com evidências sugerindo que neles ocorre secreção de um fluido intersticial cerebral que se junta ao LCR reciclado do espaço subaracnoideo aos espaços perivasculares.²⁵ Já no que se refere à absorção de líquido, estudos experimentais vem demonstrando o papel de canais linfáticos extracranianos cervicais contribuindo em até 50% da drenagem de LCR do compartimento intracraniano. Esses compartimentos se comunicam por meio do espaço subaracnoideo perineural dos nervos cranianos, além de uma via perivascular ao longo das paredes de capilares e na túnica média e adventícia de arteríolas e artérias cerebrais.²⁴ O recentemente descoberto e denominado sistema glinfático, nomenclatura proposta por Illif et al. em 2012,²⁶ promove a eliminação de proteínas solúveis e metabólitos do SNC por meio do fluxo de líquido do espaço subaracnoideo para os espaços de Virchow–Robin, facilitado

por canais de água AQP4 nos pés vasculares de astrócitos que envolvem a vasculatura cerebral.²⁷⁻²⁹

Durante a secreção do líquido, o transporte de íons e moléculas por meio da barreira hematoencefálica torna este fluido menos concentrado em proteínas, íons potássio, glicose e ureia em relação ao plasma, e com uma maior concentração de íons cloreto e magnésio. A quantidade proporcional de água do LCR também é maior em relação ao plasma (99% vs. 92%). A análise da composição do LCR tem sido amplamente utilizada para monitorar distúrbios no metabolismo cerebral, além de auxiliar no diagnóstico, prognóstico e manejo de doenças do SNC.³⁰

Especificamente em casos de NCC, o estudo do líquido tem grande importância no manejo clínico dos pacientes. Trabalhos comprovam que existe associação entre o grau de inflamação no LCR com a apresentação da doença: indivíduos mais sintomáticos possuem maior contagem de células no líquido.³¹ Além disso, a localização do parasita também influencia nos achados laboratoriais do LCR, estando a forma extraparenquimatosa mais relacionada a hiperproteínoorraquia e aumento na contagem celular líquórica.⁸ Testes imunológicos por meio da pesquisa de anticorpos ou detecção de antígenos em amostras de LCR são reconhecidamente ferramentas importantes diante de casos suspeitos de NCC, sendo o ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e o *imunoblotting* os mais utilizados e presentes nos critérios diagnósticos da doença, ao lado de achados de neuroimagem, dados clínico-epidemiológicos e outros testes laboratoriais.^{32,33,34} A presença de antígenos da *Taenia solium* no líquido tem se demonstrado, inclusive, altamente relacionada a formas ativas de NCC, apresentando-se como um marcador mais sensível do que a clássica presença de eosinofilia.³⁵ A análise laboratorial do líquido pode também ser útil durante a terapia farmacológica, uma vez que existem dados na literatura demonstrando que ocorre uma recuperação com aumento nos valores de glicose no LCR em pacientes com resposta completa ao tratamento.¹⁷

Por fim, a inflamação provocada pela *T. solium* no SNC leva, ainda, à formação de espécies reativas do oxigênio pelas células inflamatórias em decorrência do estresse oxidativo, que gera danos celulares e em macromoléculas tais como DNA, lipídios e proteínas. Estas reações, por sua vez, podem ser detectadas no líquido de indivíduos com NCC, conforme demonstrado em 2008 por Rodríguez et al. em um estudo que identificou níveis mais elevados de produtos da peroxidação lipídica nestes pacientes quando comparados ao grupo controle, havendo ainda uma correlação da presença destas moléculas com a gravidade dos sintomas e com danos ao DNA vistos em linfócitos periféricos.³⁶ Esses dados foram corroborados por um estudo publicado em 2012 por Prasad et al., quando os autores encontraram um aumento dos marcadores oxidantes malondialdeído (produto de peroxidação lipídica), nitrito e proteína carbolizada, além de redução dos antioxidantes glutathione peroxidase, ácido ascórbico, zinco, cobre, ceruloplasmina e superóxido dismutase no líquido de crianças com diagnóstico confirmado de NCC, quando comparadas ao controle.³⁷

1.3. Processo inflamatório – aspectos fisiológicos e patogênicos da Neurocisticercose

Os linfócitos representam um dos tipos de células mais importantes no processo inflamatório, e suas linhagens podem ser distinguidas com base em suas propriedades funcionais e em proteínas específicas expressas em suas membranas que agem como receptores para antígenos, permitindo o reconhecimento de diversas substâncias estranhas ao organismo. As células que apresentam a proteína CD3 em suas membranas são caracteristicamente linfócitos T, derivados do timo, enquanto que o CD19 define linfócitos do tipo B, que derivam da medula óssea. Os linfócitos B (CD19), quando ativados, proliferam-se e se diferenciam em plasmócitos, cujo papel é a secreção de anticorpos. Os linfócitos T CD8, também conhecidos como linfócitos T citotóxicos, são linfócitos T ativados com a função de induzir a apoptose de

células infectadas. Já os linfócitos T CD4, ou auxiliares, agem na ativação de outras células (dentre elas linfócitos B, T e macrófagos) e coordenam a resposta imunológica. Existem ainda as células linfoides matadoras naturais, ou *natural killers* (NK), que são desprovidas de receptores antígeno-específico, mas expressam CD56, sendo parte do sistema imune inato, reconhecendo e destruindo algumas células anormais.^{38,39}

O papel dos linfócitos T CD4 (auxiliares) pode ainda ser subdividido de duas formas distintas de acordo com a classe em que se diferenciam. Os linfócitos T auxiliares que se diferenciam em Th1 são responsáveis pela ativação de células mononucleares (linfócitos T citotóxicos CD8 e macrófagos), que atuam na imunidade celular e eliminam diretamente a célula infectada. Quando ocorre a diferenciação em Th2, por outro lado, estes linfócitos T auxiliares atuam induzindo a proliferação e diferenciação das células B (CD19) em plasmócitos, que por sua vez produzem anticorpos e, portanto, estão envolvidos com a imunidade humoral.³⁸

É sabido que as alterações nos parâmetros laboratoriais do líquido em portadores de NCC incluem um aumento na celularidade com predomínio de linfócitos, correspondendo a até 90% das células presentes no LCR.^{8,40} As linhagens de linfócitos envolvidos neste padrão inflamatório, entretanto, foram pouco estudadas até o presente momento na literatura. Em um trabalho realizado em humanos com diagnóstico de NCC, Bueno et al. estudaram a imunofenotipagem das células presentes no LCR e no sangue destes pacientes, tendo encontrado uma forte presença de linfócitos CD3, CD4 e CD8, além de uma maior porcentagem de linfócitos CD19 e CD56 quando comparados ao grupo controle, composto por indivíduos com outras doenças neurológicas inflamatórias.⁴¹ No que se refere à inflamação tecidual em casos de NCC, mais uma vez poucos são os trabalhos que estudaram o padrão linfocitário envolvido. Um estudo recente de Fleury et al. indica a presença de linfócitos T, B e *natural killers* na forma parenquimatosa da doença, variando conforme o estágio em

que se encontra o cisticerco, e linfócitos T CD4 na forma extraparenquimatosa.⁴⁰

Os trabalhos realizados em NCC têm sugerido que existem diversos fatores determinantes ao grau de inflamação que os cistos de tênia podem provocar no SNC de pessoas doentes.⁴² O número de parasitas presentes na infecção e sua localização no SNC, por exemplo, são decisivos para a resposta inflamatória envolvida.^{31,43} Cistos presentes nos sistemas ventriculares ou espaço subaracnoideo levam a um padrão inflamatório mais pronunciado, consequentemente com sintomas clínicos e danos ao tecido encefálico mais graves.³¹ Fatores relacionados ao hospedeiro, incluindo diferentes padrões genéticos, também são relevantes neste processo e podem explicar o pleomorfismo na apresentação da doença.⁴³ Kelvin et al. sugeriram um papel hormonal do hospedeiro importante para o controle da infecção parasitária, ao encontrar uma maior chance em mulheres quando comparadas a homens de desenvolver cistos “temporários”, ou seja, cistos que apresentaram degeneração em decorrência de uma resposta imunológica efetiva, sugerindo uma relação sexual/hormonal determinante no controle da doença, o que também tem sido demonstrado por outros autores, incluindo estudos experimentais que evidenciam as alterações hormonais em fêmeas em decorrência da infecção crônica por cestoides.^{44,45} Já Tharmalingam et al. buscaram caracterizar o tipo de resposta imunológica do hospedeiro a antígenos de cistos de *T. solium* e concluíram que indivíduos com múltiplos cistos apresentavam uma resposta imunológica mediada por Th2 (humoral), enquanto que infecções com cistos únicos se relacionavam a um padrão imune Th1 (celular).⁴⁶ Os autores não puderam, entretanto, definir se o número de cistos leva a um tipo específico de resposta imune ou se é consequência dele.

1.4. Modelos experimentais em Neurocisticercose

O desenvolvimento de modelos animais que mimetizem patologias humanas é crucial para o estudo das doenças. Modelos experimentais de NCC

são de grande importância no entendimento do ciclo de vida do parasita, interação hospedeiro-patógeno e na imunopatogênese da doença, permitindo-se abrir perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas.⁴⁷ Diversos animais têm sido utilizados como hospedeiros para estudos, incluindo roedores, macacos e porcos. Um dos trabalhos pioneiros em NCC induzida em laboratório foi publicado por Cardona et al. em 1999, no qual foi estudado o perfil imunológico de camundongos infectados por *Mesocostoides corti*.⁴⁸ Nos últimos anos, novos estudos foram publicados com o desenvolvimento de variações de modelos de NCC em roedores.^{16,49,50} Modelo de NCC experimental em porcos foi recentemente descrito por Fleury et al.⁵¹ Outro grupo analisou os efeitos da NCC induzida com *T. solium* em macacos, tendo sido identificadas lesões encefálicas similares à doença em humanos.⁵² Apenas um trabalho publicado na literatura até o presente momento nesta temática utilizou coelhos como objeto de estudo, com a inoculação de produtos de cisticercos (membranas e escólex ou conteúdo vesicular) no SNC dos animais, sob autoria de García de Llano et al. em 1989, porém, com curto tempo de observação (duas semanas) e sem inoculação de cistos vivos.⁵³

No que se refere ao cestóide utilizado nos modelos experimentais, o estudo pioneiro em Neurocisticercose experimental desenvolvido por Cardona et al. utilizou camundongos como hospedeiros.⁴⁸ Os autores do trabalho optaram por não inocular *T. solium* pelo fato de o parasita ter baixa infectividade nestes animais, e assim optaram pelo uso de *Mesocostoides corti*, um cestóide análogo à *T. solium*. Entretanto, o *M. corti* apresenta uma característica de alta invasibilidade ao parênquima cerebral sem equivalência com a *T. solium*, o que dificulta a interpretação dos resultados ao traçar-se um paralelo à NCC humana. Um recente modelo em ratos foi desenvolvido com o uso de *Taenia solium*, porém, a obtenção do parasita para experimentação animal é complexa e depende da ativação de oncosferas provenientes de pacientes com teníase eliminando ovos.^{50,54,55} Logo, apesar de ideal, o uso de *T. solium* em modelos experimentais demanda uma complexidade metodológica que dificulta o seu

amplo emprego. Novos modelos têm então optado, como uma alternativa viável, pela utilização de cistos de *Taenia crassiceps* em roedores para estudar NCC experimental.^{7,49}

A *T. crassiceps*, que naturalmente infecta principalmente raposas e roedores de pequeno porte, vem sendo objeto de estudos experimentais há muitos anos em diferentes animais e em topografias distintas. Seu desenvolvimento laboratorial em canídeos e roedores está bem estabelecido há décadas, enquanto que tentativas de infecção laboratorial no peritônio de coelhos ocorreram, porém sem sucesso.⁵⁶ Ainda em relação a coelhos, um modelo experimental de cisticercose ocular já foi previamente publicado, entretanto, o desenvolvimento experimental de NCC com *T. crassiceps* nestes animais ainda não foi publicado na literatura científica.⁵⁷

Um grande problema dos trabalhos previamente desenvolvidos em NCC experimental é o fato de que a grande maioria dos modelos reproduz a forma parenquimatosa da doença, que sabidamente está associada a um menor grau de alterações no líquido, conforme demonstrado por Marcin Sierra et al. em 2017, e aos casos sabidamente menos sintomáticos e menos graves da doença.⁸ Já a forma extraparenquimatosa, que ainda é um grande desafio na prática neurológica e neurocirúrgica devido à gravidade dos casos e difícil manejo, foi pouco estudada até o momento.²² Os modelos mais recentemente publicados na literatura de NCC extraparenquimatosa foram desenvolvidos por Matos-Silva et al. com *T. crassiceps* em camundongos, inicialmente estudando encefalite por meio da inoculação de cistos no parênquima dos animais, posteriormente observando presença de cistos intraventriculares e, mais recentemente, dedicando-se ao estudo de NCC intraventricular.⁶ Nosso grupo desenvolveu modelo com inoculação de cistos de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo de ratos.⁷ Este modelo possibilita um estudo mais aprofundado das alterações inflamatórias em NCC induzida em laboratório, além de ter-se demonstrado um modelo de indução de hidrocefalia crônica, mimetizando o que ocorre na prática em humanos e contrastando com os modelos experimentais de hidrocefalia

aguda e grave induzida por caulim, uma suspensão de silicato de alumínio hidratado classicamente utilizada para induzir hidrocefalia em modelos experimentais.⁵⁸ Entretanto, devido ao pequeno volume de cisternas subaracnoideas nestes animais, o modelo em ratos dificulta a análise sistemática e repetida do líquido, que demanda volumes consideráveis para análise laboratorial.

Finalmente, a avaliação do padrão inflamatório da NCC experimental nos trabalhos publicados na literatura se deteve à análise anatomopatológica dos danos ao tecido cerebral em decorrência da resposta inflamatória ou ao estudo da imunidade humoral, basicamente com a pesquisa de citocinas nos animais infectados.^{6,7,59} A análise das linhagens envolvidas na imunidade celular no tecido encefálico de animais com NCC experimental ainda segue deficitária.

2. Justificativa

O estudo da NCC experimental faz-se útil para a clínica neurológica e neurocirúrgica ao fornecer informações para o melhor entendimento da doença e desta forma identificar novas estratégias terapêuticas ou mesmo otimizar as existentes, potencialmente possibilitando assim um melhor manejo dos pacientes que se apresentem com este diagnóstico. A compreensão dos processos inflamatórios induzidos pela NCC é crucial para tal fim, e a experimentação animal proporciona o estudo destes mecanismos sob condições ideais, uma vez que permite a homogeneização da casuística e do ambiente e, conseqüentemente, o controle de potenciais confundidores na obtenção dos resultados.

Os trabalhos experimentais até aqui desenvolvidos nesta temática investigaram aspectos histopatológicos e radiológicos da doença, porém, no tocante ao padrão inflamatório se restringiram majoritariamente à pesquisa de citocinas envolvidas na resposta à presença do parasita no SNC. A análise dos padrões inflamatórios linfocíticos decorrentes da doença, em especial quais

linhagens linfocitárias estão mais envolvidas na fisiopatologia da NCC, ou mesmo os parâmetros de estresse oxidativo que também são determinantes no processo inflamatório, foram pouco estudados. Ademais, não há na literatura científica atual estudos que analisam as alterações liquóricas secundários à NCC experimental, a despeito da importância do LCR na prática clínica para o manejo da doença. Além disso, a grande maioria dos modelos se dedicou ao estudo da forma parenquimatosa, que é a menos mórbida e tem menor mortalidade associada em humanos, enquanto que os mecanismos fisiopatológicos da inflamação da NCC extraparenquimatosa seguem pouco compreendidos. Finalmente, dos modelos experimentais de NCC publicados até o presente momento, apenas um optou por coelhos como animal de escolha, inoculando no SNC apenas produtos não vivos de *Cysticercus cellulosae*, logo, sem de fato induzir à doença e com um curto tempo de observação.⁵³ Não existe, portanto, um modelo de experimental com injeção de cestoides viáveis em SNC de lagomorfos reportado na literatura, assim como o uso de *T. crassiceps* no SNC destes animais também ainda não foi previamente demonstrado.

Trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo em uma linha de pesquisa em NCC experimental já comprovaram que o modelo experimental desenvolvido por meio da inoculação de cistos de *T. crassiceps* na cisterna magna de ratos é viável e capaz de reproduzir os achados da doença em humanos, logo, permitindo estudar em detalhes as alterações no tecido encefálico provocadas pelo parasita e pela resposta inflamatória.^{7,16,60} Assim, justifica-se a realização da presente pesquisa com o intuito de analisar as linhagens linfocitárias responsáveis pela inflamação no tecido encefálico de ratos com NCC extraparenquimatosa experimental induzida pela injeção de cistos vivos de *T. crassiceps* em seu espaço subaracnoideo. Além disso, também se justifica a reprodução deste modelo de NCC extraparenquimatosa em coelhos, um animal de maior porte em relação aos roedores, permitindo-se assim o estudo sistemático das alterações no líquido destes animais e podendo-se ainda analisar

quais alterações a inoculação de *T. crassiceps* é capaz de provocar no SNC de lagomorfos.

Diante disso, em um dos dois braços deste atual estudo propusemos a análise ainda mais aprofundada deste modelo, por meio da realização de imunofenotipagem para caracterizar o padrão inflamatório linfocitário que tem papel crucial na fisiopatogenia da NCC extraparenquimatosa. No outro braço deste projeto, buscamos replicar o mesmo modelo experimental em coelhos, com o intuito de realizar análise dos parâmetros bioquímicos, citológicos e de estresse oxidativo no líquido destes animais, assim como avaliação radioanatômica dos sistemas ventriculares e cisternais e anatomopatológica dos tecidos encefálicos expostos a cistos ou solução de antígenos de *T. crassiceps*.

3. Objetivos

- Analisar a viabilidade da utilização de coelhos como hospedeiros em modelo experimental de Neurocisticercose extraparenquimatosa por meio da inoculação de cistos ou antígenos de *T. crassiceps* em suas cisternas magnas;
- Analisar e comparar a evolução temporal das alterações nos parâmetros bioquímicos, citológicos e de estresse oxidativo no líquido de coelhos inoculados com cistos ou antígenos de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo;
- Analisar os aspectos radiológicos e histopatológicos do SNC de coelhos após a exposição a cistos ou antígenos de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo;
- Analisar as linhagens linfocitárias envolvidas na resposta inflamatória presente no SNC de ratos em um modelo experimental de NCC extraparenquimatosa.

4. Materiais e Métodos

Durante a realização desta pesquisa, foi reproduzido um modelo experimental de NCC extraparenquimatosa desenvolvido recentemente pelo nosso grupo.¹⁶ Todos os experimentos foram conduzidos seguindo as resoluções do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, e iniciados apenas após a avaliação e aprovação deste comitê (protocolos 1247/2017 e 1321/2019, em anexo).

O estudo consistiu em dois subprojetos. No primeiro deles, o modelo experimental foi reproduzido em coelhos, e foram analisados os parâmetros laboratoriais do líquido após inoculação de cistos ou antígenos de *T. crassiceps*, além da análise radiológica e histopatológica dos encéfalos destes animais. No segundo subprojeto, blocos de parafina armazenados contendo cérebros de ratos de projetos anteriormente desenvolvidos pelo grupo foram utilizados para obtenção de lâminas para análise imunoistoquímica (IHQ) da expressão de marcadores linfocitários.

4.1. Parte I – coelhos

4.1.1. Animais

Nesta primeira fase da pesquisa foram utilizados 39 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos com idade média inicial de 6 semanas, divididos em dois grupos (20 no grupo 1 – cistos, e 19 no grupo 2 – antígenos). Durante todo o período de observação de 6 meses, estes animais foram mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, em gaiolas individuais alocadas em salas climatizadas (temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com exaustão e recebendo alimentação *ad libitum*. A lotação de animais respeitou o espaço de $0,28\text{m}^2/\text{coelho}$ (Figura 1).



Figura 1: Coelho alocado em sua gaiola individual.

4.1.2. Parasitas e inoculações

Foram utilizados cistos de *T. crassiceps* mantidos na cavidade peritoneal de camundongos *M. musculus* (biotério da Unipex), provenientes do projeto de manutenção e replicação de cepas registrado na instituição sob protocolo CEUA 1255/2017.

Para a inoculação intracraniana nos animais, os parasitas foram coletados de modo asséptico da cavidade peritoneal dos camundongos e selecionados em placas de Petri conforme a viabilidade morfológica (membrana íntegra e sem calcificações), presença de motilidade e tamanho adequado para passagem pela agulha de punção (Figura 2). No grupo 1 (cistos), os cestoides foram inoculados íntegros. Já para preparo da solução antigênica do grupo 2 (antígenos), os cistos também foram coletados de modo asséptico da cavidade peritoneal de camundongos, porém, sem seleção ou contagem específica, foram submetidos à sonicação (Sonics & Materials) com dois ciclos de 1 minuto a amplitude de 60%, de modo a romper suas membranas e homogeneizar com o conteúdo vesicular. O sobrenadante desta solução foi coletado e utilizado para inoculação de todos os animais do grupo 2.



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

As inoculações foram realizadas com seringas de 1mL e agulhas de 22G para punção asséptica suboccipital da cisterna magna dos animais, após anestesia com mistura de cetamina (30mg/kg), xilazina (2–5mg/kg) e acepromazina (0,05–0,01mg/kg) por via intravenosa.

Nos coelhos do grupo cistos foram injetadas, em suas cisternas magnas, soluções contendo soro fisiológico (SF) a 0,9% e 50 cistos viáveis de *T. crassiceps* num volume total de 0,6mL (densidade 1 cisto/12 μ 34L), após punção suboccipital e visualização de saída espontânea de volume semelhante de líquido (Figura 3). Nos coelhos do grupo antígenos foram inoculados, sob mesma técnica, 0,6mL da solução antigênica descrita acima.

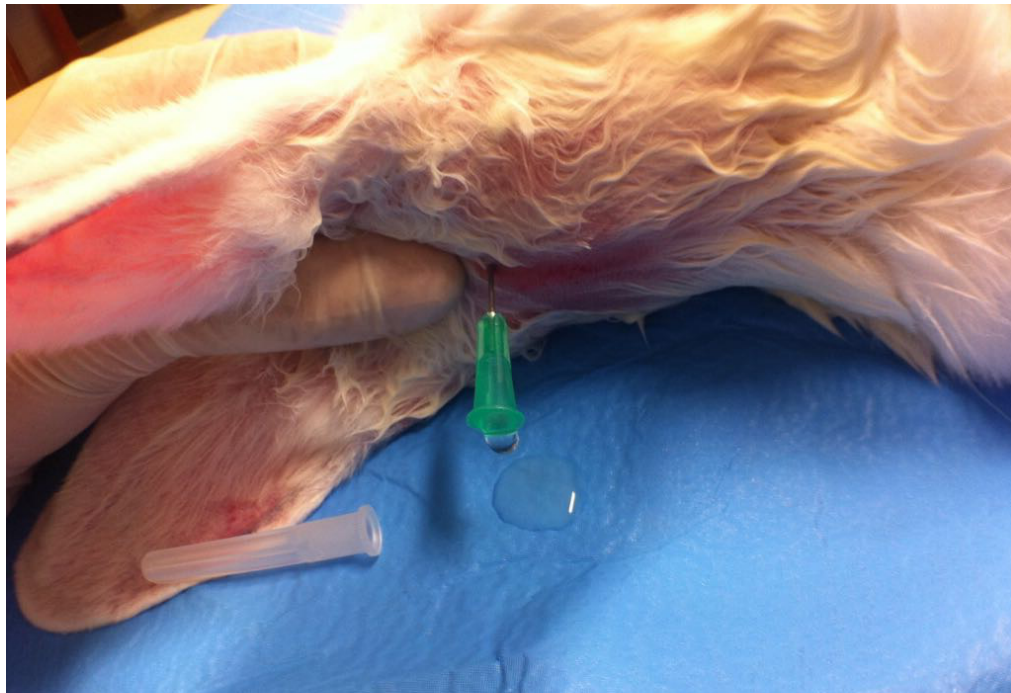


Figura 3: Fotografia ilustrando punção suboccipital à cisterna magna de coelho com saída espontânea de líquido.

4.1.3. Delineamento experimental

Os coelhos foram divididos em dois grupos: 20 animais no grupo 1 – cistos, no qual foram realizadas punções suboccipitais e injeções cisternais de 0,6mL de solução contendo 50 cistos viáveis de *T. crassiceps*, e 19 animais no grupo 2 – antígenos, que receberam volume semelhante contendo o sobrenadante da solução antigênica. Os dois grupos foram observados por um período total de 6 meses, durante o qual foram realizadas punções suboccipitais periódicas para coleta de amostras de líquido (1 a 3 mL) de modo asséptico para análise laboratorial. As amostras de cada momento foram coletadas seguindo a técnica dos três tubos com o intuito de minimizar a contaminação potencial por acidente de punção que poderia comprometer as análises, consistindo basicamente em coletar o líquido em três tubos distintos, reservando o maior volume para o último tubo, que preferencialmente seguia para análise laboratorial logo após as coletas.

Imediatamente antes das inoculações no momento inicial do estudo (T0), amostras de líquido também foram coletadas e analisadas para definição dos controles dos parâmetros avaliados (amostra controle de LCR). As coletas

subsequentes foram realizadas mensalmente em todos os animais, sendo que no grupo 2 (antígenos), houve coleta adicional a cada duas semanas nos dois primeiros meses, e no grupo 1 (cistos), houve coleta extra na 2ª semana pós inoculação para fins de comparação. Este desenho experimental foi idealizado a partir dos resultados de estudo piloto previamente realizado que demonstrou alterações inflamatórias no líquido efêmeras, ou seja, presentes apenas nos períodos iniciais de observação dos animais submetidos às inoculações, com rápida normalização dos parâmetros em especial no grupo que recebeu antígenos.

Durante todo o período de observação não foram realizados testes comportamentais específicos, mas os animais foram constantemente observados de modo subjetivo quanto ao padrão alimentar, hidratação e movimentação ativa em suas gaiolas individuais.

Imagens de Ressonância Magnética (RM) dos encéfalos dos coelhos foram obtidas no último mês de observação, quando então foi realizada eutanásia dos animais, perfusão cardíaca com SF 0,9% e solução de formol tamponado a 10% para remoção do volume sanguíneo intracraniano e fixação tecidual, e finalmente retirada dos encéfalos. Os procedimentos de perfusão foram executados por meio de cateterização proximal do arco aórtico após toracotomia, com clampeamento da aorta descendente e abertura da aurícula direita para manter o fluxo apenas no sentido cranial, e auxílio de bomba de infusão contínua para perfusão homogênea (Figura 4). Para as eutanásias, os animais receberam doses anestésicas triplicadas em relação às utilizadas para sedação para procedimentos. As remoções encefálicas foram realizadas por meio de craniectomia e dissecação para retirada *en bloc*, seguidas por fixação dos encéfalos em formaldeído 10% por 24 horas em temperatura ambiente e, após este período, secção na topografia do quiasma óptico de espessura média de 5mm, para então os cortes serem conservados em etanol absoluto e preparados para emblocamento em parafina.

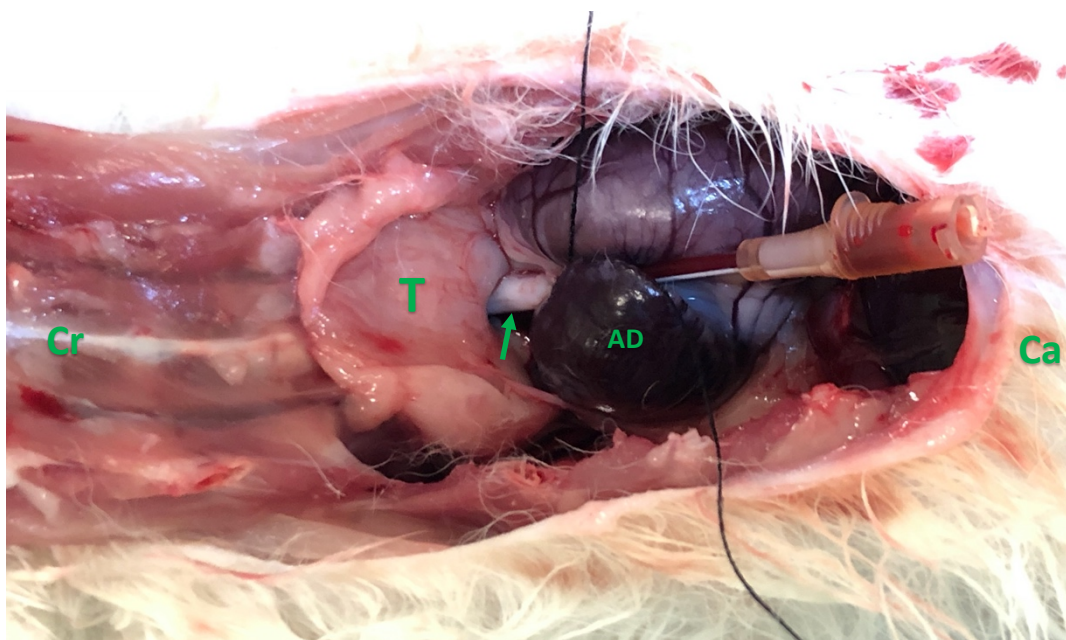


Figura 4: Cateterização do arco aórtico em coelhos. Imagem exibindo a cateterização proximal do arco aórtico (seta verde) com cateter intravenoso 14G para perfusão com salina e formaldeído tamponado 10%. AD: aurícula direita. T: timo. Cr: orientação anatômica cranial. Ca: orientação anatômica caudal.

A Figura 5 apresenta um esquema do delineamento experimental do estudo em coelhos.

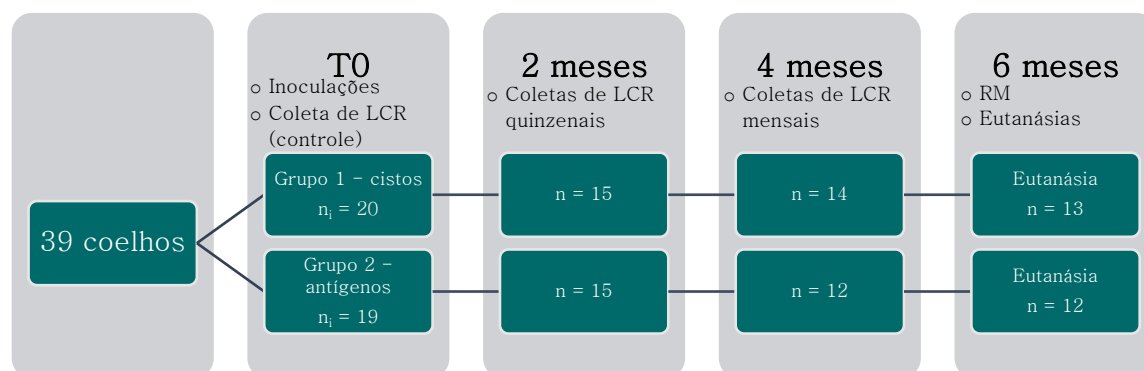


Figura 5: Delineamento do estudo em coelhos. RM: Ressonância Magnética. LCR: Líquido cefalorraquidiano.

4.1.4. Cálculo do tamanho amostral

Foi realizado cálculo do tamanho amostral utilizando-se software STATISTICA, versão 10.0, estimando-se um tamanho amostral pressupondo amostragem aleatória simples, erros tipo I e II iguais a 0,05 e 0,20, respectivamente, e ausência de potenciais fatores confundidores, igualmente

distribuídos pela randomização. O cálculo sugeriu um n mínimo final de 14 animais em cada um dos dois subgrupos de análise para estudo do líquido, caso fossem realizadas observações repetidas em apenas seis momentos distintos ao longo do período do estudo para cada animal, totalizando desta forma um mínimo necessário de 168 observações para o estudo.

4.1.5. Análise do líquido

Para a análise do líquido, foram coletadas amostras periódicas por meio de punção suboccipital da cisterna magna dos coelhos, com coleta em três tubos distintos. A primeira coleta de LCR de cada animal foi realizada no imediato momento que antecedeu as inoculações, e tais amostras foram consideradas o controle comparativo aos momentos sucessores. Os seguintes parâmetros foram analisados: contagem de células e análise diferencial, proteinorraquia, glicose e carbonilação proteica.

As amostras coletadas no tubo 3 foram as selecionadas para análise bioquímica e celular, porém, em caso de volume insuficiente, amostras do tubo 2 também foram utilizadas para tal fim, ou, caso ainda assim não houvesse volume suficiente, finalmente o tubo 1 passou a ser utilizado, sempre nesta ordem, de modo a utilizar-se preferencialmente as amostras do último tubo e assim minimizar a potencial contaminação do LCR com sangue proveniente de acidentes de punção. Após tais análises, os volumes restantes de amostras de líquido permaneceram armazenados em freezer a -80°C até o final do período de observação de todos os animais, quando então foram submetidos a descongelamento, pesquisa e quantificação de proteínas carboniladas.

Para a realização da análise citológica, de cada amostra coletada foram utilizados 20 μL através do método manual e coloração Leishman, com visualização em câmara de Fuchs Rosenthal espelhada. Contagem diferencial foi realizada a seguir em lâmina. Para análise bioquímica, dosagem de concentração proteica foi feita em equipamento automatizado BS-200 (Mindray) a partir de 200 μL de líquido. Ao final das análises citológica e bioquímica, que

foi realizada imediatamente após cada coleta, o volume remanescente de LCR coletado seguia para armazenamento por congelamento.

No que se refere à pesquisa de marcadores de estresse oxidativo, a carbonilação foi quantificada pelo método adaptado de Mesquita et al. em 100µL de LCR para 100µL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M).⁶¹ As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente sendo, então, adicionadas a 50µL de NaOH (6 M) e incubadas novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e foi então obtido o resultado da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O resultado final foi corrigido pela quantidade de proteínas na amostra e expresso em nmol/mg de proteínas.

4.1.6. Análise radiológica

Os exames de ressonância magnética foram realizados nas dependências do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, em aparelho Esaote – modelo vet MR grande, de 0,25T. Foram adquiridas imagens dos encéfalos dos coelhos entre cinco e seis meses após as inoculações (último mês de observação), com 0,6mm de espessura de corte na sequência eco gradiente 3D Hyce (tempo eco 5ms e tempo repetição 10ms). Para a realização do exame, os animais foram anestesiados com a mesma mistura anestésica descrita para os demais procedimentos. As imagens foram, então, analisadas por meio do software Horos (v.3.3.5 para macOS, EUA) para avaliação qualitativa e descritiva dos achados. A seguir, foi utilizado o software ITK-SNAP (v.3.8.0 para macOS, Pennsylvania, EUA) para volumetria manual dos ventrículos e cisternas quadrigeminais. A volumetria foi realizada por meio da marcação manual dos compartimentos ventriculares ou cisternais em cada imagem de RM no corte axial, sendo calculados automaticamente pelo software os volumes em mm^3 . Para definição das variáveis qualitativas de RM, foi inicialmente realizada a

análise descritiva das anatomias dos espaços liquóricos de modo a definir um ponto de corte numérico para classificação quanto à presença ou ausência de hidrocefalia (150mm^3) ou alargamento cisternal (100mm^3).

4.1.7. Análise anatomopatológica

Os encéfalos removidos dos coelhos, assim como as fossas cranianas após suas remoções, foram analisados macroscopicamente quanto à anatomia e procura por cistos de *T. crassiceps* no caso do grupo cistos. A seguir, os cortes padronizados na topografia do quiasma óptico foram emblocados em parafina para secção com espessura de $5\mu\text{m}$ com micrótomo e, na sequência, corados com hematoxilina-eosina. Com análise morfométrica por patologista experiente, foram avaliados os seguintes parâmetros: quantificação da densidade de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células inflamatórias, caracterização do infiltrado inflamatório e procura de parasitas nas cavidades ventriculares e espaço subaracnoideo.

4.1.8. Análise estatística

Inicialmente foram calculados médias e desvios-padrão para variáveis quantitativas e frequências e percentuais para as variáveis categorizadas, sendo as análises realizadas no geral, por momentos de observação e por grupos. Para a comparação de médias das variáveis quantitativas foi utilizado um delineamento em medidas repetidas avaliando a interação grupo *versus* momentos através de ANOVA para o caso de normalidade (ou simetria) de variável. Em caso de assimetria, o mesmo delineamento foi utilizado ajustando uma distribuição gama para variáveis contínuas ou, em caso de variáveis discretas, distribuição de Poisson ou binominal negativa. Para as variáveis categorizadas, foram feitas associações no tempo para cada grupo utilizando o teste qui-quadrado de tendência ou teste exato de Fisher. Em caso de variáveis quantitativas de distribuição anormal, o teste estatístico foi o de Mann-Whitney, já para distribuição normal, teste t de Student. Em todos os testes foi fixado o

nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas por meio do programa SAS para Windows versão 9.4 ou Prism 9 para macOS versão 9.1.1.

4.2. Parte II – ratos

4.2.1. Animais

Nesta segunda parte do projeto foi realizada imunofenotipagem de tecido cerebral de ratos submetidos à inoculação de cistos do mesmo parasita (*T. crassiceps*) sob técnica semelhante. Ao todo, foram utilizados 19 blocos de parafina armazenados contendo cérebros de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos de trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo grupo seguindo o mesmo modelo experimental.^{7,16,60} Os blocos foram cortados e preparados para a confecção de lâminas para análise imunoistoquímica. Durante os experimentos previamente conduzidos que deram origem ao material biológico utilizado, os animais haviam sido mantidos em caixas no biotério da Unipex (três animais por caixa, com 258cm² por animal), alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), de umidade e de temperatura (aproximadamente 21°C).

4.2.2. Parasitas e inoculações

As inoculações nos espaços subaracnoideos dos ratos foram realizadas nos projetos anteriores com seringas de 1mL e agulhas de 24G para punção asséptica suboccipital da cisterna magna dos animais, após anestesia com mistura de cetamina a 100mg/mL e xilazina a 20mg/mL na dose de 0,1mL/kg de peso por via intramuscular. Pelas agulhas foram inoculadas soluções de 0,2mL contendo SF 0,9% e 50 cistos viáveis de *T. crassiceps* (densidade 1 cisto/4µL), após incisão na pele de 1 cm na transição occípito-cervical e punção cisternal, seguida por sutura com fio mononylon 4.0.

Os cistos de *T. crassiceps* também provieram do projeto de manutenção e replicação de cepas (protocolo CEUA 1255/2017), mantidos na cavidade peritoneal de camundongos *M. musculus* (biotério da Unipex), e selecionados em placas de Petri sob mesmos critérios de viabilidade e tamanho para passagem pelas agulhas de inoculação.

4.2.3. Delineamento experimental

Todos os 19 ratos receberam, nas pesquisas anteriores, 50 cistos vivos de *T. crassiceps* no momento de inoculação e então foram divididos em três grupos, nos quais os tempos de observação divergiram: no grupo 1_R (n=4), as eutanásias ocorreram um mês após as inoculações; no grupo 2_R (n=11), os animais foram observados por quatro meses e então foram eutanasiados; e no grupo 3_R (n=4), seis meses. Ao final dos experimentos foi então realizada eutanásia, remoção e fixação dos encéfalos por meio de técnica semelhante à descrita para coelhos. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em banhos de álcool, clarificadas em xilol e então parafinizadas, de onde provieram os blocos utilizados no atual estudo para imunofenotipagem.

Para este trabalho, foram excluídos da amostra os animais que não desenvolveram hidrocefalia.

A Figura 6 ilustra o esquema do delineamento experimental do estudo em ratos.

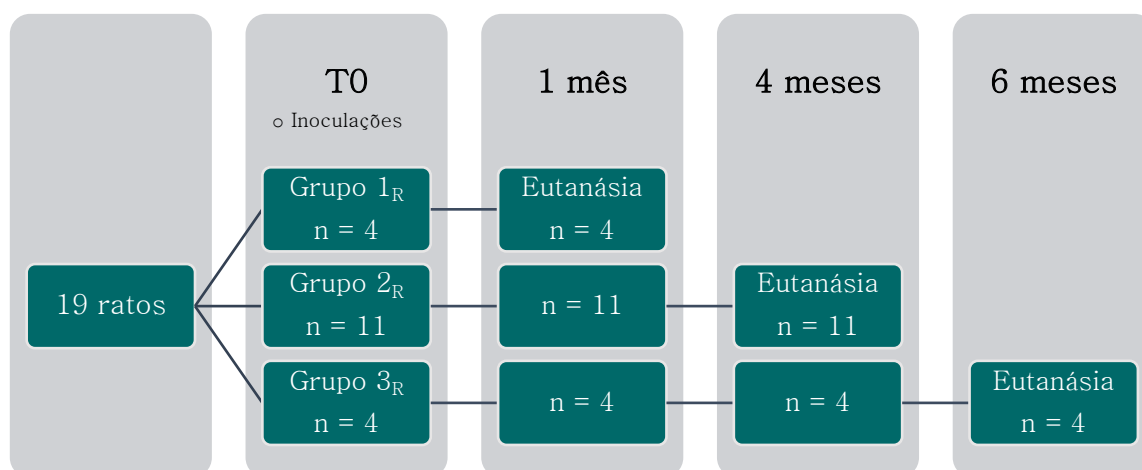


Figura 6: Delineamento do estudo em ratos.

4.2.4. Análise imunoistoquímica

Para análise das linhagens linfocitárias envolvidas no padrão inflamatório deste modelo, foi realizada pesquisa pela presença de linfócitos CD4, CD8, CD19 e CD56 por meio de IHQ dos tecidos cerebrais de ratos inoculados com *T. crassiceps*.

Os blocos de parafina acima descritos foram, nesta fase do projeto, seccionados em micrótomo com espessura de 4µm, a seguir, desparafinizados em banhos de xileno (10 minutos cada) e gradativamente reidratados em banhos de álcool de concentrações decrescentes (3 minutos cada) até a água destilada. Para recuperação antigênica, as lâminas foram aquecidas em panela de pressão elétrica, a 98–99°C, com solução tampão Citrato pH 6,0, por 20 minutos e resfriamento de 10 minutos. Em seguida, foram realizadas as colorações imunoistoquímicas. As lâminas foram, então, incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% por 30 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-linfócitos CD4, CD8, CD19 e CD56 foram, então, incubados nas lâminas por 17 horas, a 4°C, dentro de câmara úmida. Após lavagem em solução tampão, foi aplicado o anticorpo secundário polímero conjugado com a enzima peroxidase horseradish (HRP) sobre as lâminas, que foram então 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 de 5 minutos em temperatura ambiente, gerando precipitado de cor marrom no sítio de expressão da proteína alvo. Após incubação com DAB, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas com passagem em bateria de álcool e xileno e montadas com laminulas de vidro mais meio de montagem permanente.

As lâminas foram, então, analisadas por patologista experiente para quantificação da positividade para os marcadores linfocitários. Para fins

estatísticos, o grau de expressão foi categorizado em quatro grau níveis: ausente, leve, moderado ou intenso.

4.2.5. Análise estatística

Os cálculos percentuais foram realizados para as variáveis categorizadas estudadas no software Microsoft Excel para macOS, versão 16.26. Para as comparações, teste exato de Fisher foi realizado no software estatístico SPSS versão 24.0 (IBM SPSS Statistics for MacBook, IBM Corporation, Armonk, NY). O nível de significância fixado foi de 5%.

5. Resultados

5.1. Parte I – coelhos

Ao todo, foram submetidos às inoculações 39 coelhos, sendo 20 do grupo 1 (cistos) e 19 do grupo 2 (antígenos). No grupo 1 houve perda de seis animais secundária a diarreia nos três primeiros meses, além de um animal que apresentou infecção bacteriana do SNC no último mês de observação, tendo sido a última amostra de líquor deste animal excluída da análise final e mantidas as demais que precederam a intercorrência. No grupo 2 as perdas também se concentraram nos meses iniciais: nos dois primeiros meses de observação cinco animais foram a óbito durante os procedimentos de indução anestésica levando a parada respiratória, um foi a óbito devido a punção acidental do SNC em decorrência de movimentação inesperada do animal, e um animal foi perdido aos 4 meses também por falência respiratória durante o procedimento anestésico. Restaram, portanto, 13 animais no grupo 1 e 12 no grupo 2 como n final (Figura 5). Os animais foram observados por um período total de seis meses, sem desenvolverem quaisquer sintomas, mantendo o padrão de alimentação e movimentação ativa usuais durante os seis meses.

5.1.1. Alterações liquóricas

Foram realizadas ao todo 198 punções suboccipitais com coletas bem-sucedidas de líquor nos coelhos. Destas amostras, todas foram analisadas quanto à contagem celular e diferencial. Em apenas uma delas não houve volume suficiente para quantificação de concentração proteica, que, portanto, foi realizada em 197 amostras. Em 120 amostras foi possível realizar análise de marcador de estresse oxidativo (carbonilação proteica).

5.1.1.1. Bioquímica e celularidade

A celularidade média inicial imediatamente antes das inoculações (controle) foi de 1 célula/ μ L no grupo cistos, com um aumento expressivo para

1405 células/ μ L duas semanas após, seguido por um decréscimo gradual até o terceiro mês (20 células/ μ L) e a partir daí mantendo valores médios baixos quando comparados ao pico da segunda semana, porém, sem retornar a números semelhantes à média basal inicial em termos de significância estatística. No grupo antígenos, o valor médio inicial de celularidade foi de 7,5 células/ μ L, também apresentando um aumento após duas semanas (76,5 células/ μ L), porém, discreto quando comparado ao grupo cistos, e seguido por uma queda progressiva até a normalização precoce dos valores na sexta semana de observação em comparação ao controle (Gráfico 1).

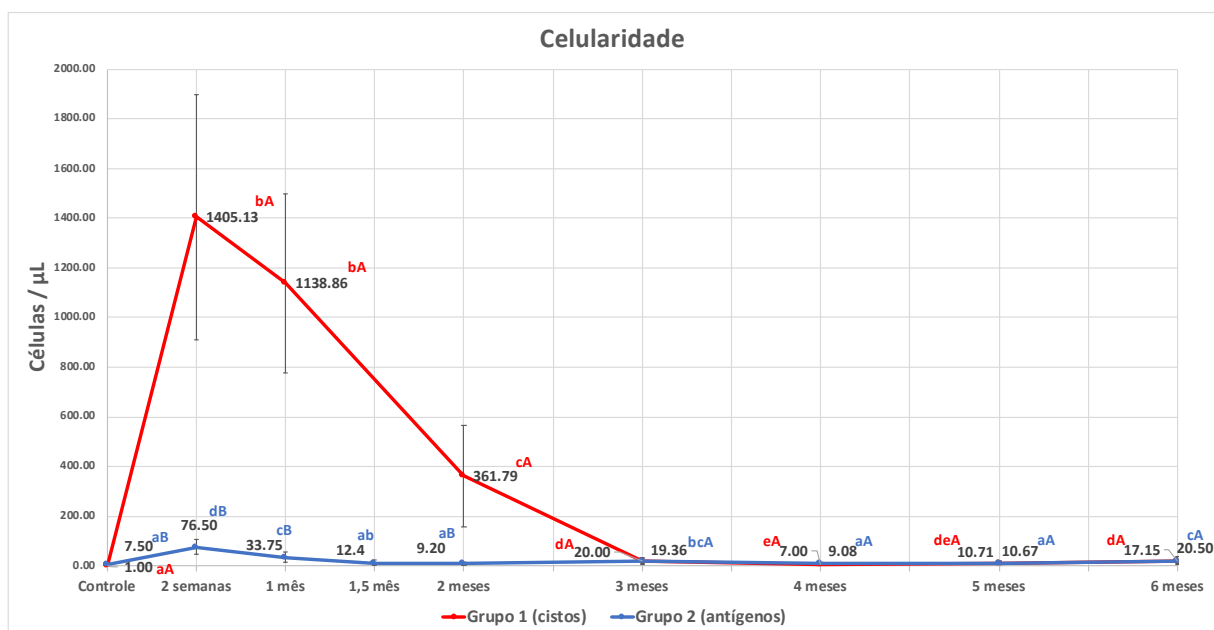


Gráfico 1. Gráfico ilustrativo das variações de número médio de células por μ L de LCR dos coelhos durante o período de observação. O grupo cistos apresentou rápido e expressivo aumento de celularidade após as inoculações, com queda progressiva e lenta a seguir; o grupo antígenos teve um aumento de dez vezes após duas semanas, comparado às médias iniciais, porém discreto em relação ao grupo cistos, seguido por queda até normalização após 1,5 mês. Letras minúsculas correspondem a comparações estatísticas dentro de um mesmo grupo em momentos distintos, e letras maiúsculas, entre os dois grupos num mesmo momento, sendo letras diferentes referentes à presença de significância estatística. Valores expressos em médias. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas.

A análise diferencial de celularidade mostrou que nos dois grupos a porcentagem de linfócitos no líquido apresentou um aumento importante logo após as inoculações, próximo ao dobro dos valores iniciais, tornando-se assim

o tipo de leucócito mais frequente nessas amostras. Nos dois grupos este padrão de predominância linfocitária foi sustentado nos meses subsequentes, com diferenças estatisticamente significativas na comparação ao controle, sendo ainda mais evidente no grupo cistos, que apresentou um predomínio de linfócitos no líquido sempre igual ou superior a 80%, em média, em todos os momentos de observação que sucederam o controle (Gráfico 2).

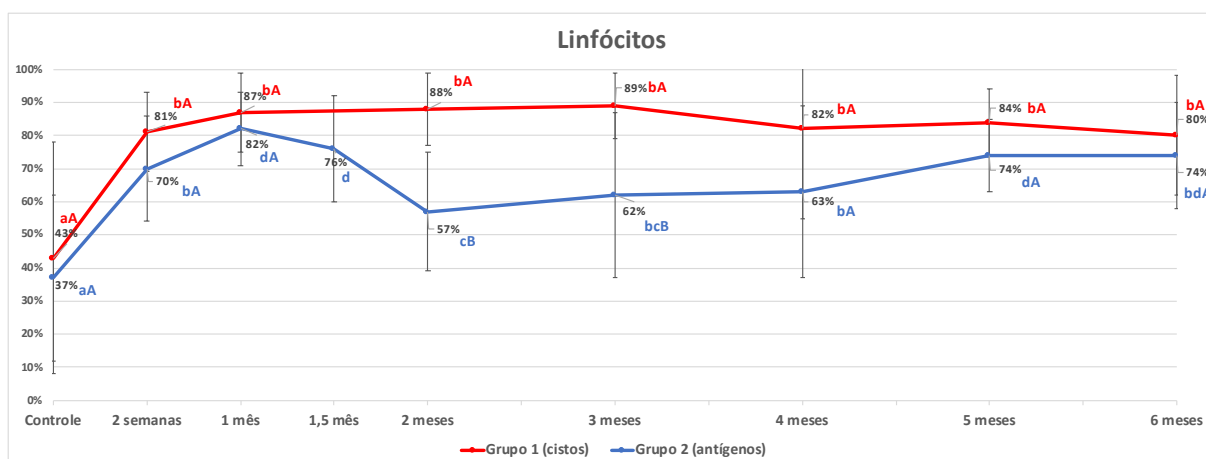


Gráfico 2. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de linfócitos na contagem diferencial celular do LCR dos coelhos durante o período de observação. Os linfócitos tornaram-se o tipo celular mais frequente nas amostras logo após as inoculações, mantendo esse padrão até o último mês em ambos os grupos. Letras minúsculas correspondem a comparações estatísticas dentro de um mesmo grupo em momentos distintos, e letras maiúsculas, entre os dois grupos num mesmo momento, sendo letras diferentes referentes à presença de significância estatística. Valores expressos em percentuais médios. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas.

Por outro lado, a porcentagem de outros tipos de células mononucleares no líquido dos animais apresentou uma queda importante após as inoculações sem recuperação ao basal, com valores médios iniciais significativamente superiores às semanas e meses subsequentes (Gráfico 3). Em relação ao gráfico representativo da presença de heterófilos no líquido, os picos da curva do grupo 2 (antígenos) estiveram associados aos momentos em que houve maior frequência de acidentes de punção (caracterizados pela visualização de hemácias livres e íntegras nas amostras), enquanto que no grupo 1 não houve flutuações estatisticamente significativas para este tipo de leucócito (Anexos I e II). Já as variações nas taxas de outros tipos celulares que incluem eosinófilos

(presentes em 15% das amostras) e macrófagos também não apresentaram significância estatística (Anexos III e IV).

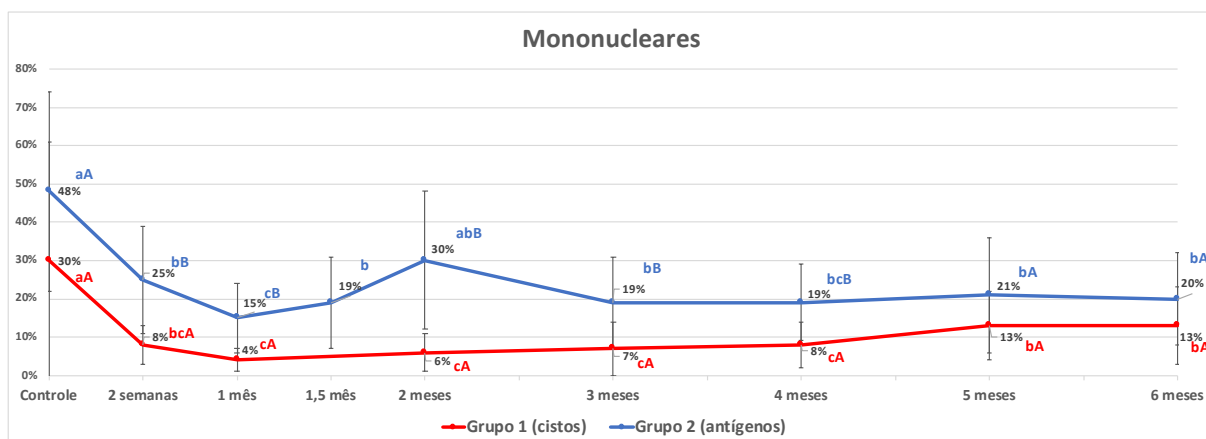


Gráfico 3. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de outras células mononucleares não linfócitos na contagem diferencial celular do LCR dos coelhos durante o período de observação. Em ambos os grupos houve queda na taxa deste tipo celular sem recuperação ao padrão basal inicial, sendo as porcentagens no grupo 1 ainda inferiores ao grupo 2 após as inoculações. Letras minúsculas correspondem a comparações estatísticas dentro de um mesmo grupo em momentos distintos, e letras maiúsculas, entre os dois grupos num mesmo momento, sendo letras diferentes referentes à presença de significância estatística. Valores expressos em percentuais médios. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas.

A curva de proteinorraquia apresentou formato semelhante em relação ao ocorrido com a celularidade no grupo 1: houve um rápido aumento nos valores médios logo após as inoculações, com uma queda gradual nos momentos posteriores, e mais uma vez sem normalização em relação ao controle. No grupo 2, por outro lado, não foram observadas flutuações com significância estatística, exceto no terceiro mês, quando houve um aumento que coincide com o pico de presença de hemácias no líquido (representativo de contaminação durante a coleta). Estes dados são apresentados no Gráfico 4.

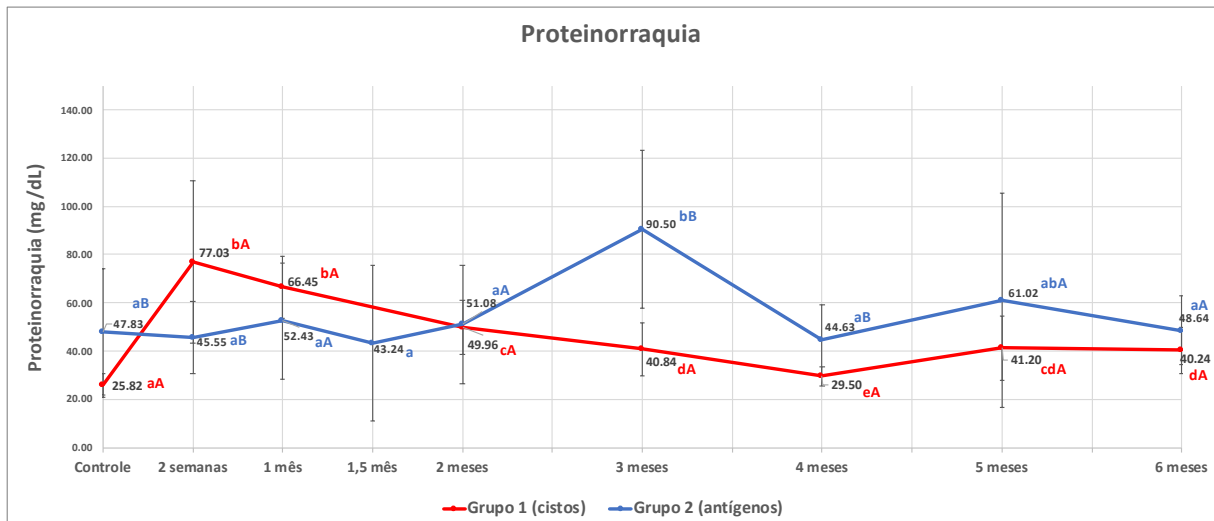


Gráfico 4. Gráfico ilustrativo das variações de proteinorraquia média no LCR dos coelhos durante o período de observação. O grupo 1 apresentou variações semelhantes ao ocorrido na celularidade, com rápido aumento logo após as inoculações, sem retorno ao padrão basal inicial, enquanto que no grupo 2 não houve variações estatisticamente significativas exceto no 3º mês, quando se observou um aumento coincidente com o momento com maior incidência de acidente de punção. Letras minúsculas correspondem a comparações estatísticas dentro de um mesmo grupo em momentos distintos, e letras maiúsculas, entre os dois grupos num mesmo momento, sendo letras diferentes referentes à presença de significância estatística. Valores expressos em médias. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas.

Ao realizar-se a análise do grupo 1 (cistos), encontrou-se uma forte correlação de Spearman entre os valores de celularidade e proteinorraquia nos momentos iniciais e final de observação. Já no que se refere ao grupo antígenos, foi encontrada correlação moderada entre as variáveis somente no último mês de observação (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação de Spearman entre os parâmetros de celularidade e proteínas no líquido durante o período de observação, por grupos.

	2 sem	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
Grupo 1	rho=0,929* p=0,001	rho=0,679* p=0,008	rho=0,561* p=0,037	rho=0,189 p=0,517	rho=0,006 p=0,985	rho=0,548* p=0,043	rho=0,785* p=0,001
Grupo 2	rho=0,147 p=0,649	rho=-0,378 p=0,225	rho=0,479 p=0,162	rho=0,079 p=0,828	rho=0,312 p=0,323	rho=0,552 p=0,123	rho=0,763* p=0,015

*Correlação forte. *Correlação moderada.

Os níveis de glicose no líquido, por sua vez, não foram influenciados pelas inoculações, mantendo-se estáveis em ambos os grupos durante todo o período de observação, com uma taxa de alteração de apenas 2% dentre todas as amostras coletadas após o momento inicial.

5.1.1.2. Estresse Oxidativo

Das 198 amostras de líquido coletadas, em 120 foi possível realizar a quantificação da carbonilação proteica por razões de volume de amostra remanescente suficiente após finalizadas as análises iniciais bioquímicas e de celularidade.

A quantidade média de carbonilas nas amostras apresentou queda logo após as inoculações, seguida por recuperação gradual nos valores, porém mantendo medições mais baixas do que o controle em todo o período de observação, em ambos grupos (Gráfico 5). Nota-se, ainda, uma queda expressiva no 3º mês para o grupo 2, mais uma vez coincidente com o momento de maior amplitude de presença de hemácias (Anexo I). O grupo 2 apresentou valores estatisticamente superiores ao grupo 1 na maior parte dos momentos do estudo.

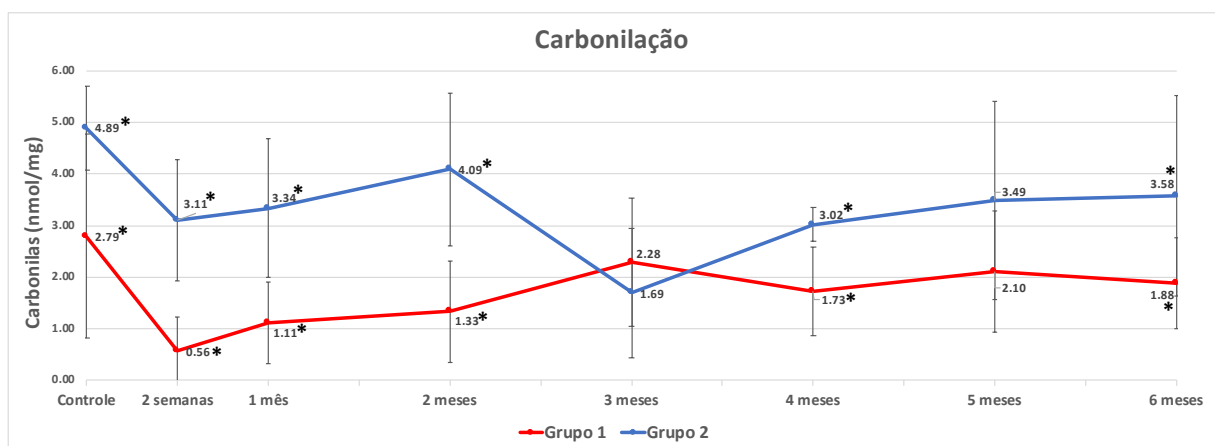


Gráfico 5. Gráfico ilustrativo das variações médias de carbonilas nas amostras de LCR de coelhos, por grupos. Em ambos os grupos a presença mais intensa da carbonilação proteica ocorreu no controle, com queda subsequente progressiva. Valores expressos em médias. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão.

* Presença de diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos nos determinados momentos. Teste estatístico: t de Student.

5.1.2. Alterações radiológicas

Na avaliação qualitativa das imagens de RM dos encéfalos dos coelhos de ambos os grupos foi possível notar aumento nas dimensões ventriculares e

cisternais, particularmente da cisterna quadrigeminal, em relação ao que normalmente se observa em coelhos saudáveis. As alterações volumétricas nessa cisterna foram frequentes (93% no grupo cistos e 67% no grupo antígenos), assim como hidrocefalia, que foi vista em mais da metade dos animais (61%). A Figura 7 ilustra os exames de RM e a reconstrução tridimensional dos sistemas ventriculares.

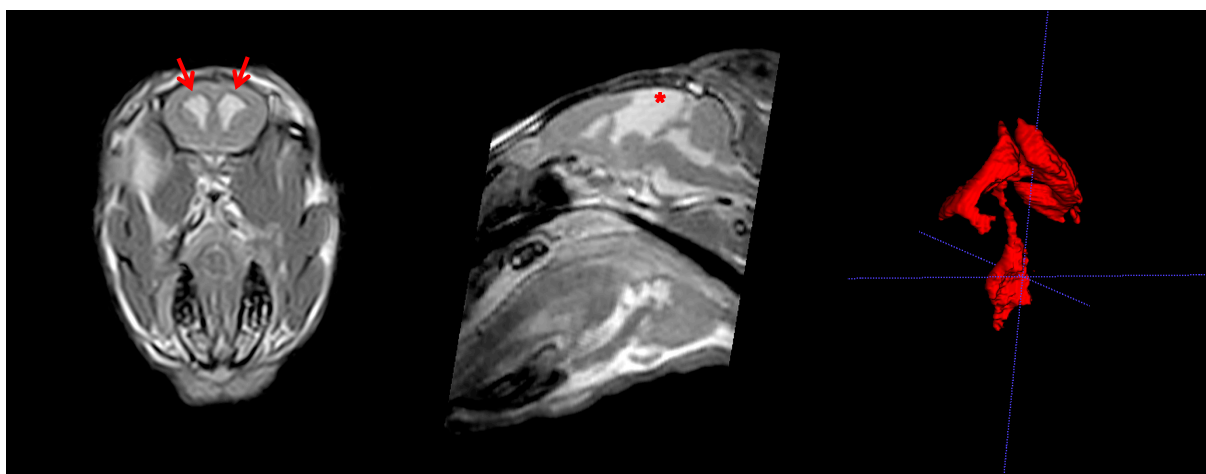


Figura 7: Estudo radiológico encefálico dos coelhos. À esquerda observa-se a RM encefálica de um dos coelhos em um corte coronal, sequência 3D Hyce, onde fica notória a dilatação dos ventrículos laterais (setas). Ao centro, corte sagital com o alargamento da cisterna quadrigeminal evidente, em comunicação direta com os sistemas ventriculares (asterisco). À direita, reconstrução manual em 3D dos sistemas ventriculares com o auxílio do software ITK-SNAP.

Para uma análise estatística mais precisa, esses volumes foram medidos com o software ITK-SNAP (v.3.8.0, Pennsylvania, EUA) utilizando-se segmentação e volumetria manual, chegando-se à conclusão que os animais expostos a cistos de *T. crassiceps* apresentaram valores superiores em ambos os parâmetros em relação ao grupo que recebeu a solução de antígenos, sendo as diferenças nas cisternas quadrigeminais entre os grupos estatisticamente significativas pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,007$). Esses dados estão exibidos na Tabela 2.

Ao analisar a correlação entre os volumes ventriculares aos cisternais dentro de um mesmo grupo, identificou-se uma forte correlação positiva de Spearman no grupo cistos ($\rho=0,657$, $p=0,011$), ausente no grupo antígenos

(rho= 0,624, p=0,054). Logo, quanto maiores as dimensões dos sistemas ventriculares dos animais inoculados com cistos de *T. crassiceps*, mais proeminente foi o alargamento encontrado da cisterna quadrigeminal (Tabela 2).

Tabela 2: Volumes ventriculares e cisternais mensurados e suas interpretações qualitativas ao final do período de observação, por grupos.

	Volume Ventricular Mediana / Intervalo (mm ³)	Volume Cisternal [†] Mediana / Intervalo (mm ³)	Hidrocefalia§	Cisternas Alargadas§
Grupo 1	240,6 (73,8–1089,0)*	186,9 (73,06–806,3)*	64,3%	92,9%
Grupo 2	156,9 (75,41–444,4)	111,0 (53,16–253,6)	55,6%	66,7%
p[†]	0,109	0,007	1,0	0,26

[†] Volume cisternal corresponde à medida da cisterna quadrigeminal.

§ As variáveis qualitativas apresentadas tiveram suas frequências definidas com base em uma análise qualitativa das imagens de RM que permitiu definir os seguintes pontos de corte: Hidrocefalia, presente quando volume dos ventrículos laterais superior a 150mm³; Cisternas Alargadas, presente quando volume da cisterna quadrigeminal superior a 100mm³.

[†] Os valores de p apresentados referem-se às comparações estatísticas entre os grupos 1 e 2 para os respectivos volumes. Os animais do grupo cistos apresentaram medidas volumétricas cisternais superiores ao grupo antígenos com significância estatística (p=0,007), porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os volumes ventriculares dos dois grupos (p=0,109), assim como na taxa de hidrocefalia e alargamento cisternal (p=1,0 e 0,26). Para as variáveis numéricas (volume ventricular e volume cisternal), foi realizado teste de Mann-Whitney. Para as categóricas (hidrocefalia e cisternas alargadas), o teste estatístico foi o exato de Fisher.

* O coeficiente de correlação de Spearman para os volumes ventriculares e cisternais dentro dos mesmos grupos apresentou forte relação estatisticamente significativa no Grupo 1 (rho=0,657, p=0,011).

Também foi realizada análise de correlação entre os achados volumétricos de RM e os parâmetros de celularidade e proteínas no líquido nos dois primeiros meses para avaliar se os animais com picos de inflamação líquórica mais proeminentes apresentaram maiores aumentos de volume ventricular ou cisternal. Não foi encontrada correlação de Spearman significativa (Tabela 3). Logo, não foi possível afirmar nessa amostra que houve algum grau de correlação entre os acentuados valores de celularidade e proteinorraquia nas fases iniciais após as inoculações com o aumento volumétrico cisternal ou ventricular visto nas imagens de RM ao final do período de observação.

Tabela 3: Correlação de Spearman entre os volumes ventriculares e cisternais e os parâmetros de celularidade e proteínas no líquido nos dois primeiros meses de observação, por grupos. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os parâmetros de líquido e de imagem.

		Volume Ventricular		Volume Cisternal	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Proteínas	2ª semana	rho=0,48 p=0,911	rho=0,417 p=0,265	rho=0,381 p=0,352	rho=0,450 p=0,224
	1º mês	rho=0,20 p=0,946	rho=0,567 p=0,112	rho=-0,007 p=0,982	rho=0,383 p=0,308
	2º mês	rho=0,116 p=0,692	rho=-0,143 p=0,760	rho=-0,121 p=0,681	rho=-0,071 p=0,879
Celularidade	2ª semana	rho=-0,119 p=0,779	rho=0,250 p=0,516	rho=0,167 p=0,693	rho=-0,2 p=0,606
	1º mês	rho=-0,411 p=0,144	rho=0,150 p=0,7	rho=-0,262 p=0,366	rho=0,267 p=0,488
	2º mês	rho=-0,103 p=0,725	rho=0,714 p=0,071	rho=-0,233 p=0,422	rho=0,679 p=0,094

5.1.3. Alterações anatomopatológicas

Após as craniectomias e remoções encefálicas, não foram encontrados cistos de *T. crassiceps* nas cavidades intracranianas ou encéfalos (Figura 8). A anatomia encefálica encontrava-se, de modo geral, normal, exceto pela transição supra-infratentorial, que se mostrou alargada e em continuidade com a cisterna quadrigeminal nos animais que apresentaram alargamento cisternal nas RM.



Figura 8: Aspecto encefálico dos coelhos imediatamente após a remoção. À esquerda, fotografia em visão superior: na região inferior da imagem, encontram-se os dois lobos frontais, e no topo, o cerebelo. Ao centro, fotografia ainda em visão superior observando-se em detalhe a transição supra e infratentorial (indicada pela seta vermelha) que se continua com a cisterna quadrigeminal alargada, confirmando os achados de RM. À direita uma visão inferior, podendo ser identificado o quiasma óptico e o assoalho do III ventrículo na região central da imagem, assim como o tronco encefálico acima. Em todas as imagens fica evidente a ausência macroscópica de conteúdo sanguíneo encefálico, removido durante o procedimento de perfusão, além da ausência de cistos de *T. crassiceps*, que não foram visualizados em qualquer peça anatômica.

O achado histopatológico mais frequente (70%) nas lâminas dos coelhos analisados foi a presença de meningite linfocitária discreta, em ambos os grupos. O infiltrado linfocitário foi visualizado em diversas topografias dos encéfalos dos animais de ambos os grupos, principalmente periventricular, subependimário ou perivascular (Figura 9).

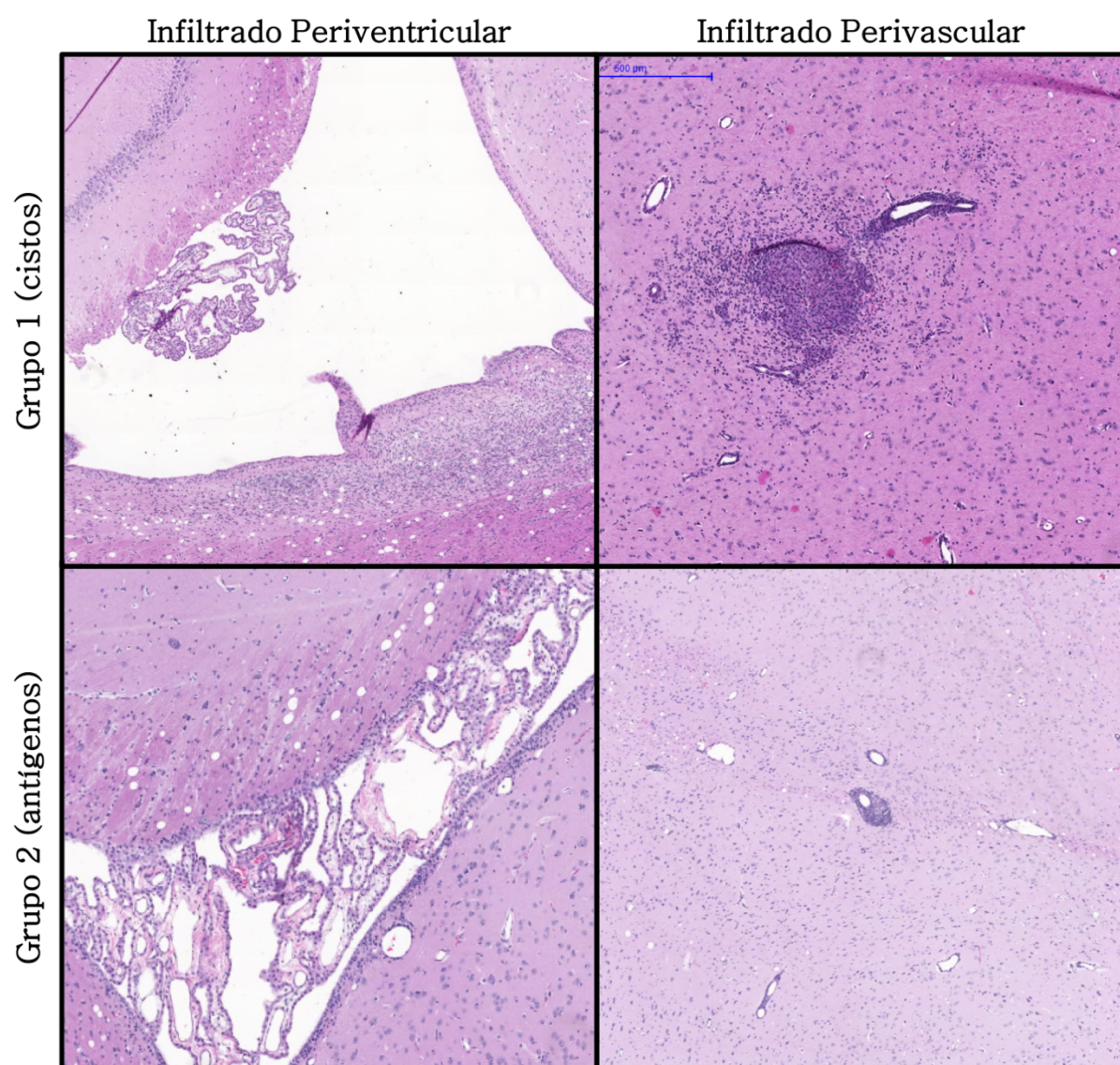


Figura 9: Infiltrados periventriculares e perivasculars em lâminas de encéfalos de coelhos. Coloração: HE.

Em relação à quantificação das densidades celulares realizada por meio de morfometria, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quanto às densidades de oligodendrócitos, astrócitos ou células inflamatórias. Já a densidade de neurônios apresentou-se inferior no grupo que recebeu inoculação de cistos (grupo 1) em relação ao grupo 2 (antígenos), com significância estatística ($p=0,0121$). A figura 10 contém os gráficos com as análises estatísticas para as variáveis descritas, e a figura 11 apresenta duas lâminas representando cada um dos grupos, nas quais é possível observar a distribuição dos neurônios.

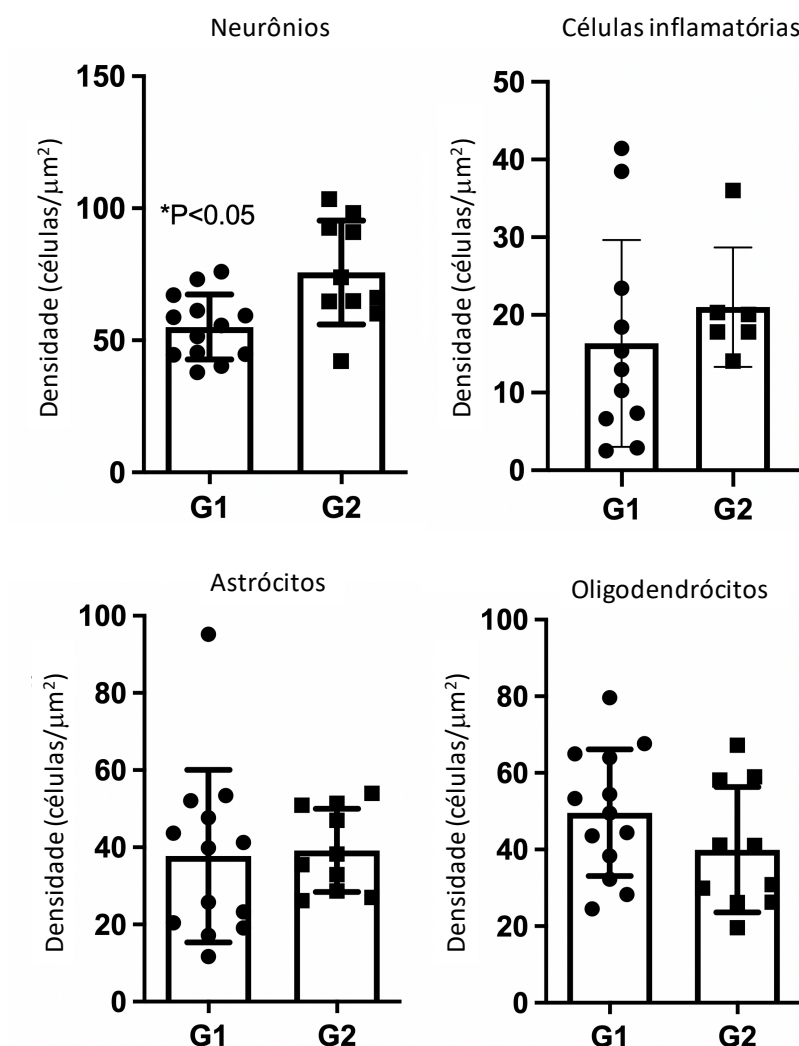
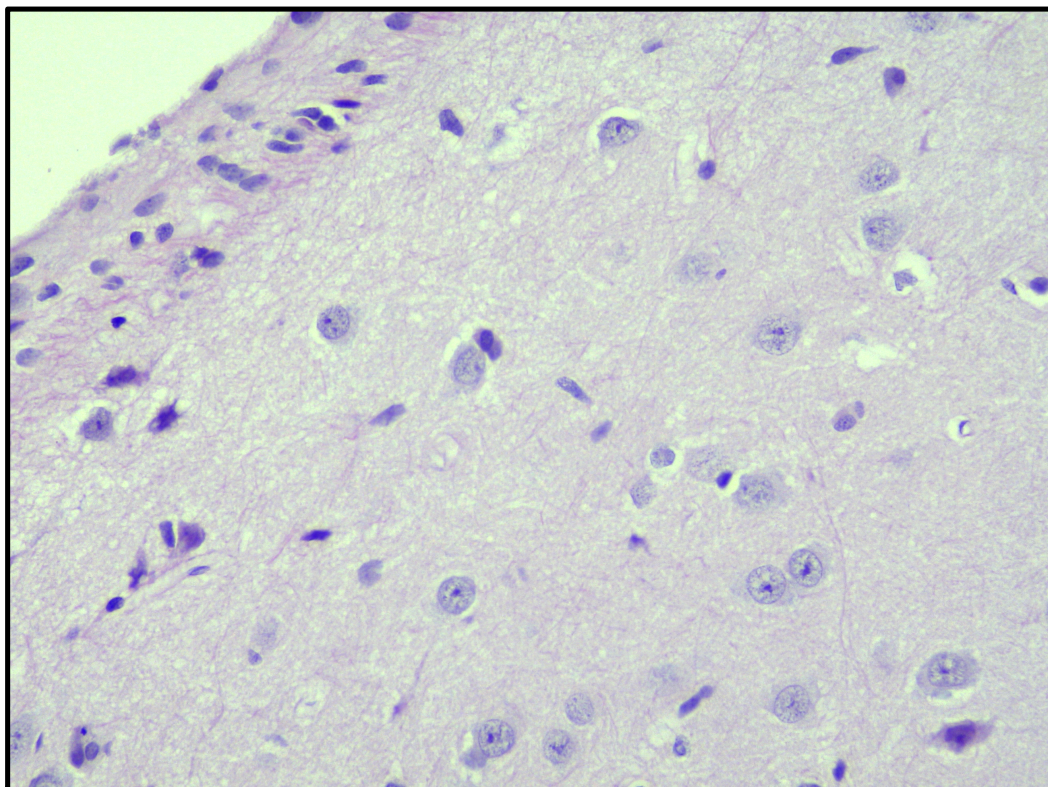


Figura 10: Gráficos referentes às comparações entre os dois grupos quanto às densidades celulares quantificadas na análise histopatológica. Ao topo, à esquerda, gráfico das densidades de neurônios ilustrando as diferenças entre os dois grupos: o grupo cistos apresentou uma menor densidade em relação ao grupo antígenos, com significância estatística ($p=0,0121$). As densidades das demais células analisadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Testes estatísticos: Mann-Whitney. G1: grupo 1 (cistos). G2: grupo 2 (antígenos).

Grupo 1 (cistos)



Grupo 2 (antígenos)

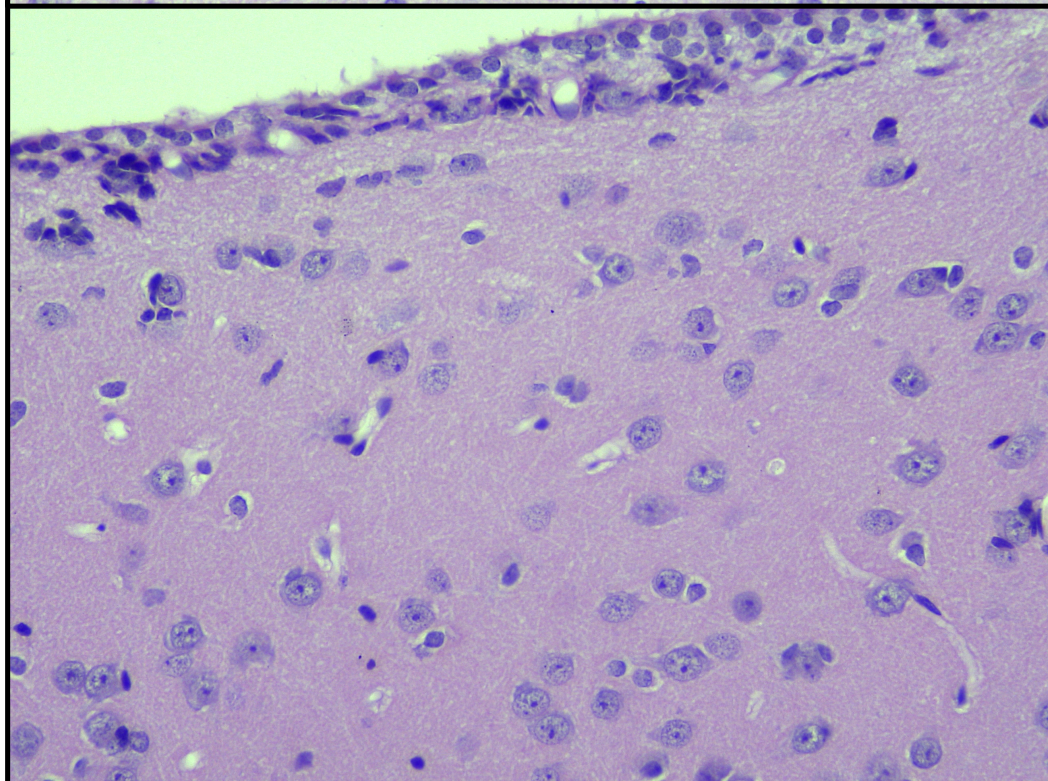


Figura 11: Cortes histológicos de encéfalos de coelhos corados por HE. É possível notar-se uma menor densidade de neurônios na lâmina do animal do grupo 1 (acima) em relação ao grupo 2 (abaixo).

5.2. Parte II – ratos

5.2.1. Alterações imunoistoquímicas

Todos os blocos disponíveis de encéfalos de ratos foram incluídos na análise de imunofenotipagem por IHQ: ao todo, 19 animais e quatro marcadores diferentes de linfócitos, com um total de 76 lâminas para o estudo.

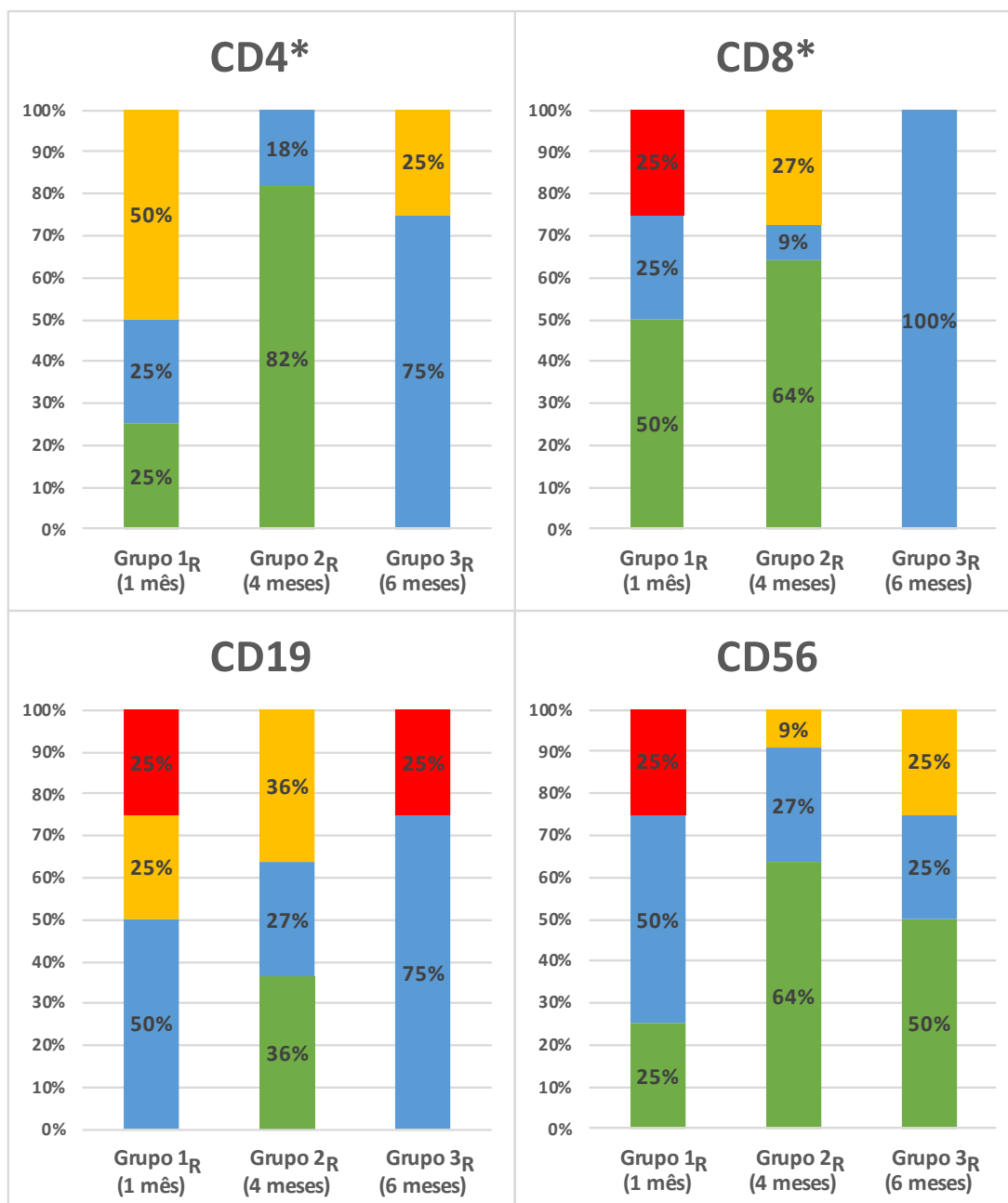
De modo geral, observou-se nas lâminas contendo tecidos encefálicos de ratos inoculados com cistos de *T. crassiceps* graus variados de expressão para os quatro marcadores linfocitários estudados (CD4, CD8, CD19 e CD56) em cada tempo de observação (Gráfico 6).

Na comparação entre os três grupos (grupo 1_R, grupo 2_R e grupo 3_R), que correspondem a tempos distintos de observação, as expressões imunoistoquímicas de CD4 apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,014$), com um padrão bimodal de picos no 1º e 6º meses pós inoculação: a maior parte (75%) das lâminas com encéfalos de ratos inoculados com *T. crassiceps* apresentou expressão de grau leve a moderada de CD4 no grupo 1_R (um mês de observação), e todas apresentaram expressão de leve a moderada no grupo 3_R (seis meses), enquanto que a maioria das lâminas não teve expressão (82%) no grupo 2_R (quatro meses).

O marcador CD8 também apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,006$) na análise temporal, com um pico de expressão 6 meses após as inoculações: 50% das lâminas do grupo 1_R (1 mês) e 64% do grupo 2_R (4 meses) não apresentaram expressão ao marcador, enquanto que no grupo 3_R (6 meses), todas as lâminas apresentaram expressão leve de CD8.

Já o CD19 apresentou uma tendência de distribuição temporal de expressões semelhante ao CD4 na análise comparativa intergrupos, com todas as lâminas apresentando algum grau de expressão nos grupos 1_R e 3_R, sendo 25% delas com expressão intensa no 1º mês (grupo 1_R), contrastando com o grupo 2_R, no qual em 36% não foi visualizada expressão. Essas diferenças, entretanto, não apresentaram significância estatística ($p=0,204$). As diferenças

nas taxas de expressão do CD56 em análise análoga também não atingiram resultados estatisticamente significativos ($p=0,435$).



■ Ausência de expressão ■ Expressão Leve ■ Expressão Moderada ■ Expressão Intensa

Gráfico 6: Expressão imunoistoquímica dos marcadores linfocitários CD4, CD8, CD19 e CD56. A expressão de CD4 ocorreu mais frequentemente no Grupo 1_R (1 mês de observação) e no Grupo 3_R (6 meses de observação), com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,014$). A expressão de CD8 apresentou pico no Grupo 3_R (6 meses), quando todas as lâminas apresentaram grau leve de expressão imunoistoquímica, com significância estatística em relação aos demais grupos ($p=0,006$). As variações temporais em expressão imunoistoquímica dos marcadores CD19 e CD56 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Valores expressos em percentuais. Teste estatístico realizado: exato de Fisher.

* Marcadores com diferenças estatisticamente significativas.

A figura 12 apresenta fotografias de lâminas coradas por IHQ para cada um dos quatro marcadores estudados.

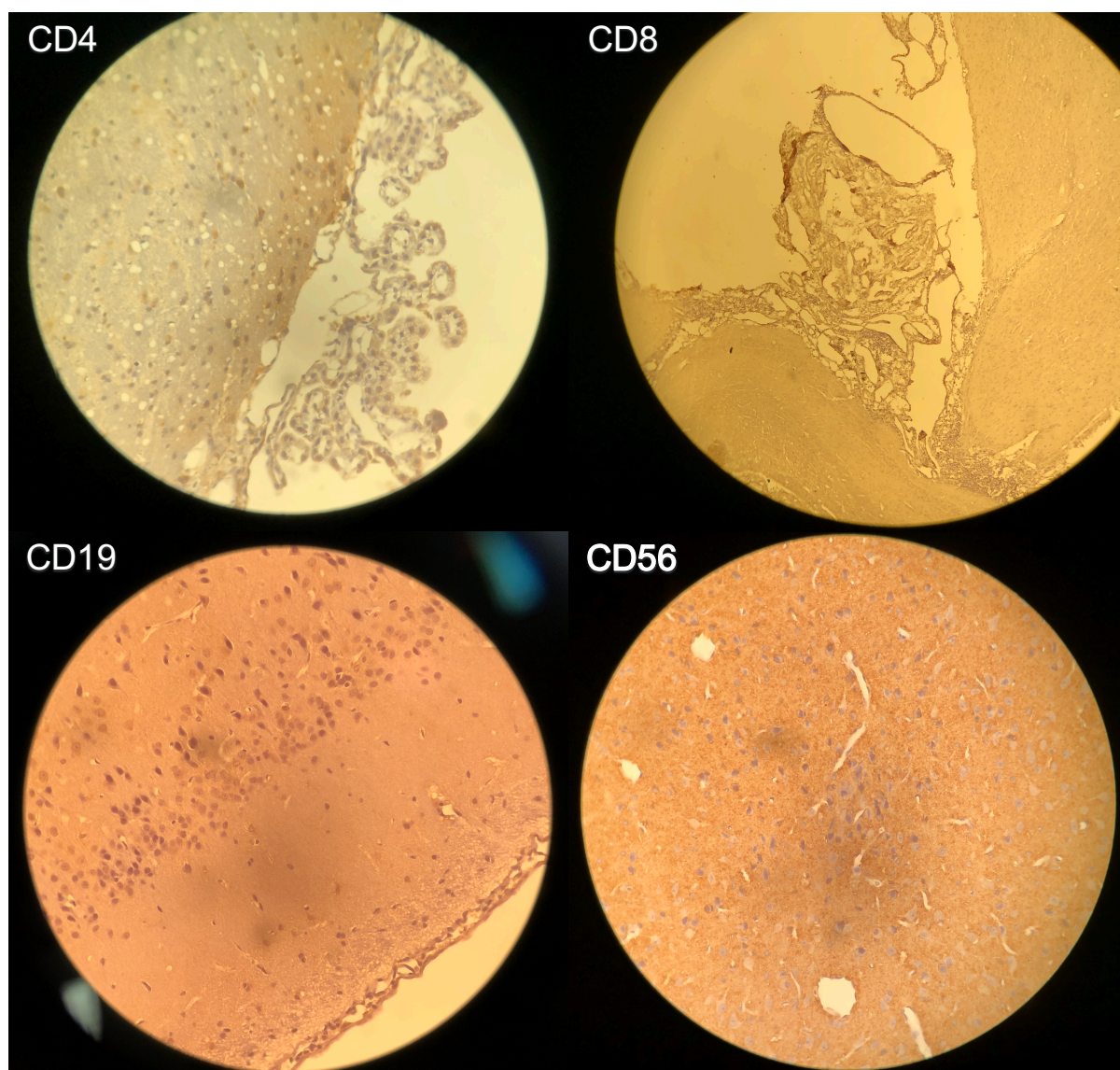


Figura 12: Análise imunoistoquímica dos marcadores linfocitários em tecido cerebral de ratos. *Acima:* expressão moderada de CD4 e expressão leve de CD8 após 6 meses de observação. *Abaixo:* expressão intensa de CD19 e de CD56 ao final do 1º mês de observação.

6. Discussão

Modelos experimentais que contribuam para o entendimento aprofundado das doenças e para a busca de métodos terapêuticos mais eficazes ainda são fundamentais para o desenvolvimento da ciência e da medicina. Os detalhes e minúcias dos mecanismos fisiopatológicos das doenças podem ser melhor conhecidos em um ambiente altamente controlado da experimentação animal, minimizando os potenciais vieses e heterogeneidade dos ambientes não controlados. Por outro lado, também são reconhecidas as falhas da pesquisa experimental, que não consegue reproduzir perfeitamente todos os aspectos da doença humana em especial devido às diferenças inerentes às espécies estudadas quando comparadas aos seres humanos. Por este motivo, a busca pelos modelos ideais é constante.⁶²

Em NCC experimental os estudos iniciais datam do final da década de 90, quando Cardona et al. analisaram os aspectos da resposta imune em camundongos inoculados com *M. corti*.⁴⁸ A partir daí, diversos outros trabalhos nesta área de pesquisa foram desenvolvidos, com uma predominância pela escolha de roedores como animais objeto de estudo, mas também com o uso de macacos e porcos.^{16,49,50,51,52} Diversos aspectos da doença já foram descritos na literatura, mas a maioria dos estudos focaram nos aspectos inflamatórios da forma parenquimatosa da NCC, que é sabidamente a que tem evolução menos grave na prática clínica, enquanto que a forma extraparenquimatosa, de evolução mais mórbida e fatal, foi menos estudada. Diante dessa realidade, nosso grupo de pesquisa recentemente desenvolveu um modelo experimental de NCC extraparenquimatosa por meio da inoculação de cistos vivos de *T. crassiceps* na cisterna magna de ratos, avaliando os aspectos histopatológicos e radiológicos nestes animais, além das alterações secundárias à hidrocefalia apresentada.^{7,16,60} Entretanto, a análise do líquido, importante ferramenta no manejo clínico do paciente com a forma mais grave da NCC, não havia sido previamente realizada neste modelo, assim como a análise fenotípica do

infiltrado inflamatório linfocitário encontrado no tecido encefálico destes animais. Por este motivo foi proposta a realização do presente estudo, de modo a entender mais detalhadamente os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações descritas neste modelo experimental.

A escolha de coelhos como hospedeiros para a replicação deste modelo de NCC extraparenquimatosa induzida por *T. crassiceps* deu-se pela necessidade de seleção de um animal de maior porte – logo, com maior volume líquórico na cisterna magna – que permitisse a realização de coletas periódicas de líquido com amostra suficiente e que ao mesmo tempo mantivesse as características de facilidade de manuseio e logística em ambiente laboratorial. Ressalta-se que a inoculação experimental de cistos vivos de *T. crassiceps* no SNC de lagomorfos ainda não havia sido previamente reportada na literatura, e a escolha de coelhos como hospedeiros em Neurocisticercose experimental é incomum.^{56,57}

No presente estudo, confirmamos a viabilidade da técnica de inserção de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo de coelhos e comprovamos que ocorrem modificações inflamatórias no líquido e tecido encefálico desses animais, sendo mais expressivas as alterações nos parâmetros do LCR nas semanas iniciais após as inoculações com cistos vivos quando comparados à solução antigênica, além do desenvolvimento de hidrocefalia e alargamento de cisternas cerebrais na maior parte dos animais. Não pudemos, entretanto, identificar por quanto tempo os cestoides permanecem vivos no SNC de lagomorfos após a inoculação no espaço subaracnoideo ou se ocorre a reprodução assexuada e multiplicação dos mesmos, uma vez que, durante a remoção dos encéfalos após os 6 meses de observação não identificamos a presença de cistos nos tecidos encefálicos ou no crânio dos animais, e antes disso, nas imagens de RM também não foi possível visualizar cistos nos sistemas ventriculares e cisternais. Vale ressaltar, porém, que tais imagens foram obtidas em um aparelho de 0,5T, portanto com baixa definição para a melhor identificação dos cestoides. Idealmente, em um futuro trabalho, poderia ser realizada avaliação radiológica

periódica mais precoce e em um aparelho com campo magnético de maior intensidade, permitindo assim determinar por quanto tempo os cistos permanecem íntegros no SNC dos coelhos até que ocorra a degeneração.

A análise laboratorial do LCR de coelhos saudáveis foi previamente descrita na literatura, com contagem de leucócitos variando até 4/ μ L no trabalho de Jass et al. em 2008, e até 7/ μ L em um estudo mais antigo de Curiel et al. em 1982.^{63,64} O grupo alemão reportou, ainda, concentração proteica normal variando de 13 a 31 mg/dL. Estes valores estão em acordo com o que encontramos nos nossos animais no momento inicial que antecedeu as inoculações intracranianas (amostra controle de LCR), exceto por valores médios encontrados para proteinorraquia discretamente superiores no grupo antígenos, o que pode ter ocorrido em decorrência da contaminação por sangue durante a coleta de algumas amostras, enquanto que no trabalho citado os autores excluíram quaisquer amostras com sinais de acidentes de punção para determinar com acurácia os valores de normalidade. Destaca-se, ainda, que a composição líquórica após as inoculações na nossa casuística modificou-se expressivamente para um padrão com hiperproteinorraquia e hipercelularidade não só em relação ao basal inicial, mas também na comparação aos valores de referência previamente reportados: as médias de contagem de células após duas semanas no grupo cistos atingiram 1405/ μ L (200 vezes maior que o limite reportado como normal), e a concentração proteica, 77mg/dL (2,4 vezes o limite superior de normalidade).

Além do aumento significativo inicial nos parâmetros do LCR dos animais, observou-se que a inflamação provocada pelas inoculações apresentou um padrão de cronificação, com uma queda e aproximação dos valores considerados normais apenas após três meses, porém mantendo valores acima do limite superior de normalidade reportado por outros autores nos últimos meses de observação.⁶³ Encontramos também correlação estatística entre as variáveis celularidade e proteinorraquia em determinados momentos nas análises de cada grupo, em especial nos meses iniciais de observação, que

corresponde ao pico da inflamação líquórica. Além disso, nos dois grupos houve uma modificação persistente no padrão celular leucocitário presente no líquido dos animais: mesmo após a queda número de células e da concentração proteica, os linfócitos permaneceram como o tipo celular predominante no LCR em altas taxas percentuais quando comparadas aos valores iniciais. Esses achados sugerem uma inflamação crônica no LCR dos animais com predomínio linfocitário, e são compatíveis com o que se espera encontrar na análise laboratorial do líquido de pacientes em vigência de NCC, em particular da forma extraparenquimatosa da doença.^{8,10,40} Já a presença de eosinofilorraquia ocorreu em 15% de todas as amostras, também de acordo com dados da literatura sugestivos de que, apesar de classicamente descrita na síndrome líquórica da NCC, seu achado é infrequente.^{8,65}

Destaca-se que as alterações encontradas foram mais proeminentes no grupo submetido à inoculação de cistos vivos de *T. crassiceps* comparativamente ao grupo antígenos. Esses dados seguem a mesma linha dos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa com este modelo experimental em ratos.^{7,60} Novos estudos derivados do mesmo modelo sugerem que concentrações antigênicas mais altas são capazes de levar a maiores aumentos ventriculares e redução de neurônios periventriculares em ratos.⁶⁶ Vale ressaltar que no presente estudo reproduzido em coelhos, apesar de o número de cistos *T. crassiceps* inoculados ter sido o mesmo que no modelo anterior em ratos, a densidade da solução inoculada foi três vezes inferior em coelhos. Isso não foi o suficiente para levar a uma baixa resposta inflamatória no SNC desses animais, uma vez que as alterações líquóricas foram significativas nos períodos iniciais após as inoculações no grupo cistos. Sabe-se, entretanto, que um alto número de parasitas em pacientes com NCC determina uma resposta inflamatória mais intensa, e modelo recente de Fleury et al. demonstrou que quanto maior o número de oncosferas implantadas em porcos, mais cistos viáveis se desenvolvem nos hospedeiros.^{43,51} Logo, em futuros trabalhos reproduzindo este modelo experimental em coelhos, sugere-se a adição de um

grupo inoculado com uma solução com densidade superior de cistos, de modo a analisar se os achados inflamatórios podem ser mais proeminentes ou mesmo se os cistos teriam uma maior possibilidade de permanecerem viáveis durante o período de observação.

Não encontramos, no presente estudo, uma associação do marcador de estresse oxidativo analisado com a inflamação presente no LCR dos animais: o grupo 2 (antígenos) teve valores de carbonilação superiores ao grupo 1 (cistos) em quase todo o período de observação, contrastando com os demais parâmetros do líquido, que mostraram uma presença significativamente maior de células inflamatórias e concentração proteica no grupo 1. Além disso, nota-se que os valores médios de carbonilas apresentaram queda após as inoculações em comparação ao controle, momento no qual a inflamação pelos cistos ou produtos de *T. crassiceps* ainda não havia ocorrido, já que precedeu a própria inoculação. Esses dados divergem do que se encontra na literatura, que sugere uma maior presença de oxidantes no líquido de pacientes com NCC, refletindo um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio como resultado do processo inflamatório vivenciado por pessoas infectadas.^{36,37} Essa discrepância possivelmente deve-se a viés nas amostras analisadas, seja pelo método e tempo prolongado de armazenamento ou pela contaminação de amostras com sangue em decorrência de acidentes de punção. Em futuros trabalhos, esse parâmetro pode ser melhor avaliado com a análise laboratorial imediatamente após as coletas, e em amostras sem qualquer contaminação de sangue, uma vez que os produtos de espécies reativas de oxigênio são extremamente sensíveis à luz e amostras contaminadas com sangue alteram os valores reais, podendo assim levar a resultados imprecisos.

No que se refere à técnica para coleta de líquido em coelhos, trabalhos mais antigos sugeriam a implantação de sistema de drenagem alocado no III ventrículo para permitir a coleta de múltiplas amostras de LCR em um período de 30 dias, similar a uma derivação ventricular externa utilizada em humanos, entretanto, sabe-se dos potenciais de infecção bacteriana associados a um

procedimento deste tipo, além de requerer um procedimento cirúrgico para o implante do dispositivo.⁶⁷ Mais recentemente, outros autores compararam as técnicas possíveis para a coleta (trepanação craniana, punção lombar ou punção suboccipital), e concluíram que o método de punção da membrana atlanto-occipital é o mais simples e mais rápido, e permite coletas repetidas.⁶⁸ A adição da ultrassonografia para auxiliar essa técnica também é possível, especialmente quando a punção às cegas é difícil, porém, demanda um recurso a mais a ser preparado e analisado durante a coleta.⁶⁹ Nossa experiência mostrou que a punção repetida da membrana atlanto-occipital com coleta de LCR da cisterna magna sob sedação venosa é um procedimento de execução prática viável. Dos 39 animais estudados, com um total de 198 amostras coletadas, apenas em um deles houve morte súbita por punção acidental do SNC em decorrência de uma sedação leve com inesperada movimentação do animal durante o procedimento, e em outros seis houve óbito por parada respiratória após a sedação e antes mesmo das punções. Ressalta-se que as perdas se concentraram nos meses iniciais de observação, quando os animais ainda eram jovens e de menor peso, logo, mais sensíveis aos efeitos anestésicos no sistema respiratório. Este tipo de complicação pode ser minimizado conforme a evolução da curva de aprendizado da equipe envolvida nos procedimentos e o uso moderado e cauteloso dos fármacos. Pode-se, ainda, realizar suporte ventilatório por meio da intubação orotraqueal, conforme descrito por Jass et al., porém isso demanda mais um procedimento invasivo, que dificulta a praticidade da realização de um número alto de punções como fizemos neste trabalho.⁶³ Vale ressaltar, ainda, que apesar das perdas descritas, a grande maioria das coletas ocorreu sem maiores complicações e riscos para os animais e de modo simplificado, demonstrando que esta é uma técnica viável em coelhos.

Quanto às demais complicações inerentes ao procedimento de punção ao espaço subaracnoideo, a mais frequente foi a ocorrência de acidentes com contaminação das amostras por sangue, presentes em mais da metade dos casos. Esses eventos, que podem ser comprovados por uma elevação na

contagem de hemácias no LCR, levam à alteração dos parâmetros laboratoriais do líquido não correspondendo aos valores reais, e assim prejudicam a análise dos dados. Coletas de líquido traumáticas são comuns em humanos. Renard et al. encontraram uma frequência de 22% dos procedimentos de punção lombar quando houve tentativa única, podendo chegar a 45% caso múltiplas punções sejam necessárias para a coleta, estando associadas ainda a técnicas inadequadas e uso de agulhas traumáticas, achado corroborado por outros autores.^{70,71} Considerando que os animais da nossa casuística foram submetidos a punções repetidas em curto intervalo de tempo, sempre no mesmo sítio (suboccipital) e conseqüentemente levando a um processo cicatricial local com certo grau de prejuízo à localização anatômica e à técnica, compreende-se a alta incidência de acidentes na amostra. Nos nossos resultados foi realizada correção estatística para padronização dos valores, mas ainda assim, pôde-se observar que, nos momentos em que mais hemácias foram visualizadas nas amostras, houve um aumento na frequência de heterófilos, bem como elevação, em determinados momentos, na concentração proteica no LCR dos animais do grupo 2 incompatível com o esperado segundo a tendência apresentada pelo grupo 1. A interpretação cuidadosa dos parâmetros de líquido, portanto, é fundamental para a compreensão adequada dos resultados, sempre levando-se em consideração a presença de hemácias como sugestiva de contaminação por sangue capaz de alterar os valores analisados.

Outra complicação apresentada foi a infecção bacteriana do SNC de um dos animais no último mês de observação, a despeito da técnica de antisepsia realizada antes e durante as coletas. Essa é uma possibilidade para qualquer tipo de procedimento que envolva invasão ao SNC, e no nosso trabalho tivemos uma baixa incidência, considerando que apenas uma das 198 coletas evoluiu com meningite (0,5%). Esses dados estão de acordo com o reportado na literatura, reafirmando a raridade da meningite bacteriana pós punção para coleta líquórica.^{72,73}

No que se refere aos achados de RM, pôde-se identificar uma alta taxa de hidrocefalia (60%), e ainda maior de aumento de volumes cisternais (83%) nos animais estudados, em particular da cisterna quadrigeminal. Demonstramos, portanto, que em coelhos ocorre alteração da hidrodinâmica liquórica após a injeção de cistos ou de antígenos de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo (cisterna magna), assim como foi visto em ratos nos trabalhos anteriores deste mesmo modelo experimental.^{7,60} No presente estudo, entretanto, não visualizamos a presença dos cistos nas imagens de RM adquiridas ao final do período de observação. Isso poderia reafirmar a importância do componente inflamatório na etiologia da hidrocefalia neste modelo caso os cistos tenham sofrido degradação precoce após a inoculação. Por outro lado, os cistos poderiam em tese levar a uma hidrocefalia obstrutiva por bloqueio mecânico do fluxo liquórico nos sistemas ventriculares até sua degradação, assim como encontrado no modelo em ratos com hidrocefalia obstrutiva pela presença de cistos. Logo, não podemos concluir qual é o real mecanismo de hidrocefalia neste modelo em coelhos sem saber por quanto tempo os cistos permanecem viáveis no SNC desses animais.

Na análise estatística entre os parâmetros liquóricos e radiológicos não encontramos correlações estatisticamente significativas. Isso vai de encontro ao que se esperaria de acordo com o que é compreendido da fisiopatologia da doença e suas consequências à hidrodinâmica do SNC em decorrência da inflamação provocada. Chavarría et al. em 2005 reportaram uma maior frequência de gravidade de sintomas em pacientes que se apresentam com alto grau de inflamação liquórica.³¹ Sabe-se, também, que a etiologia da hidrocefalia na NCC extraparenquimatosa encontra-se diretamente relacionada à inflamação apresentada pelos hospedeiros em resposta à presença dos cisticercos no espaço subaracnoideo, levando à formação de exsudatos densos e infiltrados celulares que promovem espessamento de leptomeninges e aracnoidite basal, além do aumento da viscosidade do LCR que ocorre em condições de hiperproteínoorraquia.^{22,74} Dessa forma, seria plausível encontrar uma

correlação entre os altos valores de celularidade e concentração proteica e as alterações na hidrodinâmica líquórica dos animais, ou mesmo observar uma maior frequência de hidrocefalia e alargamento cisternal nos coelhos do grupo cistos na comparação com o grupo antígenos, o que não ocorreu nos nossos resultados. Futuros estudos nessa temática poderiam auxiliar a compreender melhor tais correlações.

Neste trabalho não encontramos sintomatologia nos animais estudados, que mantiveram o mesmo padrão de alimentação e movimentação durante todo o período de observação, a despeito das proeminentes alterações laboratoriais inflamatórias do líquido ou dos achados radiológicos de hidrocefalia. Uma hipótese é que os animais possam ter sido observados durante o período inicial assintomático da doença, assim como ocorre em pacientes com NCC que permanecem sem sintomas por longos períodos logo após a infecção inicial.⁷⁵ Diversos autores já apresentaram dados que comprovam a interação entre os cisticercos e outros parasitas e o sistema imunológico dos hospedeiros, possuindo a capacidade de modular a inflamação da pessoa infectada por meio da indução de um fenótipo linfocítico regulatório.⁴⁰ Esse mecanismo está associado ao período assintomático que os doentes vivenciam logo após as infecções, em decorrência da evasão e supressão da resposta imune do hospedeiro pelos cisticercos viáveis.⁷⁶ Mais recentemente, Souza et al. demonstraram em um modelo experimental animal que antígenos de *T. crassiceps* exercem efeitos de atenuação de lesões cerebrais secundárias a neurotoxoplasmose, demonstrando que, por si só, os antígenos também exercem papel crucial nessa interação, independente da viabilidade dos cisticercos.⁷⁷ Mais estudos fazem-se necessários para o total entendimento em detalhes deste processo de interação entre os parasitas e o sistema imunológico do hospedeiro.

Outra possibilidade que justificaria a ausência de sintomas exuberantes nos animais é que a resposta inflamatória do sistema imunológico dos coelhos tenha sido eficaz a ponto de rapidamente conter ou degradar os cistos ou

antígenos, antes mesmo do aparecimento de sintomatologia clínica. Já a hidrocefalia tardia e de desenvolvimento crônico provavelmente permite a atuação dos mecanismos de contenção de hipertensão intracraniana e assim previne o surgimento de sintomas. Isso também foi encontrado e recentemente discutido em publicação referente a este modelo experimental em ratos.⁶⁰

A análise histopatológica dos encéfalos dos coelhos revelou a presença de meningite linfocitária discreta em ambos os grupos após seis meses das inoculações, principalmente com infiltrado periventricular e perivascular. Esses achados eram esperados de acordo com os resultados da análise líquórica, que evidenciou a leve presença de leucócitos predominantemente linfocitários nas fases mais tardias de observação. Os estudos anteriores deste mesmo modelo experimental em ratos também demonstraram a presença de infiltrado inflamatório linfocítico periventricular e subependimário.^{7,60} O presente trabalho, entretanto, é o primeiro a demonstrar esses achados após longo período de observação em coelhos que tiveram seus espaços subaracnoideos expostos a cistos ou antígenos de *T. crassiceps*.

Ressalta-se, ainda, o achado de densidade de neurônios inferior no grupo inoculado com cistos de *T. crassiceps* em comparação ao grupo antígenos, possivelmente efeito da resposta inflamatória mais pronunciada vista no líquido dos animais deste grupo nas fases iniciais de observação, quando ocorre o pico de inflamação. Achado semelhante foi visto em trabalho anterior do nosso grupo com este mesmo modelo quando comparando os efeitos de concentrações distintas de antígenos de *T. crassiceps* inoculados em ratos. Naquele trabalho foi encontrada uma densidade de neurônios inferior no grupo inoculado com alta concentração de antígenos, bem como foi observado um maior aumento nos volumes ventriculares nestes animais.⁶⁶ Em conjunto, todos esses achados sugerem que a intensa reação inflamatória neste modelo causada por cistos ou por uma alta concentração de antígenos de *T. crassiceps* é capaz de causar redução da densidade neuronal a nível histopatológico.

Finalmente, os resultados da análise IHQ sugerem a presença de linfócitos envolvidos na inflamação provocada pelos cistos de *T. crassiceps* neste modelo de NCC extraparenquimatosa experimental. Linfócitos B (CD19), NK (CD56), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8) foram expressos mesmo nas fases mais tardias de observação após inoculação do parasita em ratos, reproduzindo o que outros autores encontraram em humanos com NCC.^{40,41}

A expressão bimodal de CD4 nos tecidos encefálicos de ratos com picos 1 mês e 6 meses após a inoculação evidencia o padrão inflamatório acentuado inicialmente e com cronificação em fases mais tardias, reforçando os demais achados de inflamação líquórica em coelhos neste mesmo modelo, que por sua vez apresentaram um pico inicial seguido por predomínio linfocitário persistente. Já o padrão de expressão com pico tardio de CD8 também corrobora a hipótese de uma resposta inflamatória com tendência à cronificação neste modelo. A presença desses linfócitos T auxiliares tardiamente após a exposição aos cistos de *T. crassiceps* evidencia a complexa resposta inflamatória central crônica ainda não completamente compreendida, mas sabidamente influenciada por outras células e mediadores centrais e periféricos que atuam regulando a inflamação no SNC de doentes com a forma extraparenquimatosa da doença.⁷⁸

É possível que a resposta inflamatória intensa logo após as inoculações seja eficaz no controle inicial da infestação parasitária, levando a uma queda nos marcadores inflamatórios líquóricos e na quantidade de linfócitos presentes, conforme observado na queda de celularidade no LCR dos coelhos após o pico inicial e diminuição de expressão linfocitária nos tecidos encefálicos de ratos no 4º mês. Os mecanismos regulatórios, entretanto, não parecem ser capazes de retomar o padrão basal celular, visto que após 6 meses das inoculações a expressão dos marcadores linfocitários nos ratos apresenta um pico tardio para CD4 e CD8, e o líquor dos coelhos não retorna ao padrão celular inicial.

7. Conclusões

- O modelo de NCC extraparenquimatosa experimental com inoculação de cistos ou antígenos de *T. crassiceps* na cisterna magna de coelhos demonstrou-se ser viável e capaz de provocar alterações expressivas no SNC desses animais, entretanto, cistos vivos de *T. crassiceps* não foram encontrados nos encéfalos dos animais ao final do período de observação de seis meses.
- A inoculação de cistos ou antígenos de *T. crassiceps* no espaço subaracnoideo de coelhos provoca aumentos significativos na celularidade e proteinorraquia do líquido dos animais por até três meses após as exposições, seguida por recuperação progressiva, com resultados mais marcantes decorrentes da inoculação de cistos, além de levar a uma predominância linfocitária persistente no padrão celular líquido. Entretanto, não observamos neste estudo variações na presença de marcadores do estresse oxidativo concordantes com a inflamação provocada pelo cestóide.
- Os coelhos expostos a cistos ou antígenos de *T. crassiceps* em seus espaços subaracnoideos evoluem, em sua maioria, com aumento nos volumes ventriculares e cisternais, particularmente da cisterna quadrigeminal. A nível histopatológico, após seis meses de exposição eles apresentaram, em sua maioria, meningite linfocitária discreta, e os coelhos inoculados com cistos apresentam uma menor densidade de neurônios em relação aos expostos a antígenos.
- Os tecidos encefálicos de ratos expostos a cistos de *T. crassiceps* em seus espaços subaracnoideos apresentaram expressão aos marcadores linfocitários CD19 e CD56 sem variações temporais estatisticamente significativas, ao marcador CD4 em uma apresentação bimodal com picos no 1º e 6º meses após as inoculações, e ao CD8 com pico no 6º mês, ambos com significância estatística.

8. Referências

1. Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop* 2003 Jun;87(1):43–51.
2. Mullins C, Muniz JA, Sandoval H, Padilla O, Ramos-Duran L. Neurocysticercosis of the fourth ventricle associated with hydrocephalus. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2017 Jul;30(3):365–7.
3. Minozzo JC. Teníase/Cisticercose: Teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para imunodiagnóstico da Cisticercose bovina. Curitiba. Dissertação [Mestrado em Patologia Veterinária] – Universidade Federal do Paraná; 1997.
4. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC Jr, et al. Neurocysticercosis: Neglected but Not Forgotten. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 May;6(5):e1500.
5. de Lange A, Mahanty S, Raimondo JV. Model systems for investigating disease processes in neurocysticercosis. *Parasitology* 2019 Apr;146(5):553–62.
6. Moura VBL, Lima SB, Matos-Silva H, Vinaud MC, Loyola PRAN, Lino RS. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology* 2016 Mar;143:334–42.
7. 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 Jan;33(1):119–23.
8. Marcin Sierra M, Arroyo M, Cadena Torres M, Ramírez Cruz N, García Hernández F, Taboada D, et al. Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLoS Negl Trop Dis* 2017 Jun;11(6):e0005646.

9. Lange O. Síndrome líquórica da cisticercose encéfalo-meningéia. *Rev Neurol Psiquiatr* 1940 Mar-Apr;6(2):35-48.
10. 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 Oct;73(10):852-5.
11. Livramento JA. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. *Arq Neuropsiquiatr* 1981 Sep;39(3):261-78.
12. Center for Disease Control. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. *MMWR Recomm Rep* 1993 Dec;42:1-38.
13. Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Cavalcanti MG, Alencar CH, Heukelbach J. Reprint of “Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death”. *Acta Trop* 2017 Jan;165:170-8.
14. Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Cavalcanti MG, Alencar CH, Heukelbach J. Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death. *Acta Trop*. 2016 Jan;153:128-36.
15. Agapejev S. Aspectos clínico-epidemiológicos da Neurocisticercose no Brasil: análise crítica. *Arq Neuropsiquiatr* 2003 Sep;61(3B):822-8.
16. 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 Dec;30(12):819-23.
17. Osorio R, Carrillo-Mezo R, Romo ML, Toledo A, Matus C, González-Hernández I, et al. Factors Associated With Cysticidal Treatment Response in Extraparenchymal Neurocysticercosis. *J Clin Pharmacol* 2019 Apr;59(4):548-56.

18. Robles C, Chavarria Chavarria M. [Report of a clinical case of cerebral cysticercosis treated medically with a new drug: praziquantel]. *Salud Publica Mex* 1979 Sep-Oct;21(5):603-18.
19. Toledo A, Osorio R, Matus C, Martinez Lopez Y, Ramirez Cruz N, Sciutto E, et al. Human Extraparenchymal Neurocysticercosis: The Control of Inflammation Favors the Host...but Also the Parasite. *Front Immunol* 2018 Nov;9:2652.
20. Zymberg, ST. Neurocysticercosis. *World Neurosurg* 2013 Feb;79(2):S24.e5-8.
21. Colli BO, Martelli N, Assirati Júnior JA, Machado HR, Salvarani CP, Sassoli VP, et al. Cysticercosis of the Central Nervous System. I. Surgical Treatment of Cerebral Cysticercosis: A 23 Years Experience in the Hospital Das Clínicas of Ribeirão Preto Medical School. *Arq Neuropsiquiatr* 1994 Jun;52(2):166-86.
22. Hamamoto Filho PT, Zanini MA, Fleury A. Hydrocephalus in Neurocysticercosis: Challenges for Clinical Practice and Basic Research Perspectives. *World Neurosurg* 2019 Jun;126:264-71.
23. Orešković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev* 2010 Sep;64(2):241-62.
24. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS* 2014 May;11:10.
25. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 2004 Sep;45(4):545-52.
26. Illif JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 15;4(147):147ra111.
27. 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 Sep;17(4):295–306.
- 28.Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System – A Beginner's Guide. *Neurochem Res* 2015 Dec;40(12):2583–99.
 - 29.Plog BA, Nedergaard M. The glymphatic system in CNS health and disease: past, present and future. *Annu Rev Pathol* 2018 Jan;13:379–94.
 - 30.Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008 May;5:10.
 - 31.Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 2005 Sep;116(3):271–8.
 - 32.Sako Y, Takayanagui OM, Odashima NS, Ito A. Comparative Study of Paired Serum and Cerebrospinal Fluid Samples from Neurocysticercosis Patients for the Detection of Specific Antibody to *Taenia solium* Immunodiagnostic Antigen. *Trop Med Health* 2015 Sep;43(3):171–6.
 - 33.Del Brutto OH, Nash TE, White AC Jr, Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 2017 Jan 15;372:202–10.
 - 34.Silva GB. Avaliação de frações antigênicas de *Taenia crassiceps* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico das formas ativa e inativa da neurocisticercose humana em amostras de líquido cefalorraquidiano. Uberlândia. Dissertação [Mestrado em Imunologia e Parasitologia aplicadas] – Universidade Federal de Uberlândia; 2016.
 - 35.Abraham R, Pardini AX, Vaz AJ, Livramento JA, Machado LR. Taenia antigens detection in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis and its relationship with clinical activity of the disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2004 Sep;62(3B):756–60.

- 36.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 Oct;102(10):1025-31.
- 37.Prasad R, Anil, Mishra OP, Mishra SP, Upadhyay RS, Singh TB. Oxidative stress in children with neurocysticercosis. *Pediatr Infect Dis J* 2012 Oct;31(10):1012-5.
- 38.Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR, organizadoras. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2009.
- 39.Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol* 2017 Jul;8:892.
- 40.Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunol* 2016 Mar;38(3):147-57.
- 41.Bueno EC, Machado LR, Livramento JA, Vaz AJ. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). *Acta Trop* 2004 Jul;91(2):205-13.
- 42.Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010 Apr;104(4):243-50.
- 43.Sciutto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A. Human neurocysticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect* 2013 Jun;15(6-7):524-30.
- 44.Kelvin EA, Carpio A, Bagiella E, Leslie D, Leon P, Andrews H, et al. The association of host age and gender with inflammation around

- neurocysticercosis cysts. *Ann Trop Med Parasitol* 2009 Sep;103(6):487–99.
- 45.Veloz A, Reyes-Vázquez L, Patricio-Gómez JM, Romano MC. Effect of mice *Taenia crassiceps* WFU cysticerci infection on the ovarian folliculogenesis, enzyme expression, and serum estradiol. *Exp Parasitol* 2019 Dec;207:107778.
 - 46.Tharmalingam J, Prabhakar AT, Gangadaran P, Dorny P, Vercruysse J, Geldhof P, et al. Host Th1/Th2 immune response to *Taenia solium* cyst antigens in relation to cyst burden of neurocysticercosis. *Parasite Immunol* 2016 Oct;38(10):628–34.
 - 47.Arora N, Tripathi S, Kumar P, Modal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol* 2017 Jul;39(7):e12439.
 - 48.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 Jan;162(2):995–1002.
 - 49.Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VB, Vinaud MC, et al. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr* 2012 Apr;70(4):287–92.
 - 50.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 Aug;185(8):2259–68.
 - 51.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 Aug;9(8):e0003980.
 - 52.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. ScientificWorldJournal 2014 Dec;2014:248049.
53. García de Llano CA, Mateos JH, Rivas Hernández A. Inflammatory reaction in neurocysticercosis in experimental studies in rabbits. Arch Invest Med (Mex) 1989 Jan-Mar;20(1):61-8.
 54. Mejia Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter ES, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, et al. Cysticercosis Working Group in Peru. Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. Brain Pathol. 2019 May;29(3):425-36
 55. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Delgado-Kamich AD, Celiz RH, Trompeter G, Sutherland G, et al. Changes in inflammatory gene expression in brain tissue adjacent and distant to a viable cyst in a rat model for neurocysticercosis. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Apr 27;15(4):e0009295. Online ahead of print.
 56. Freeman RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). Can J Zool 1962 40(6):969-90.
 57. Cárdenas F, Plancarte A, Quiroz H, Rabiela MT, Gómez-Leal A, Correa D, et al. *Taenia Crassiceps*: Experimental Model of Intraocular Cysticercosis. Exp Parasitol 1989 Nov;69(4):324-9.
 58. Catalão CHR, Souza AO, Santos-Júnior NN, da Silva SC, da Costa LHA, Alberici LC, et al. Kaolin-induced hydrocephalus causes acetylcholinesterase activity dysfunction following hypothalamic damage in infant rats. Brain Res. 2019 Dec 1;1724:146408.
 59. Milhomem AC. Aspectos histopatológicos da Neurocisticercose experimental e perfil de citocinas em camundongos C57BL/6. Goiânia. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública] - Universidade Federal de Goiás; 2017.
 60. Hamamoto Filho PT, Fogaroli MO, Oliveira MAC, Oliveira CC, Batah SS, Fabro AT, et al. A Rat Model of Neurocysticercosis-Induced

- Hydrocephalus: Chronic Progressive Hydrocephalus with Mild Clinical Impairment. *World Neurosurg* 2019 Dec;132:e535–e544.
- 61.Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* 2014 Aug;458:69–71.
 - 62.Paulus W. Experimental models of neurological disease: neuropathology determines what is virtual reality, science or fiction. *Acta Neuropathol* 2017 Feb;133(2):153–4.
 - 63.Jass A, Matiasek K, Henke J, Küchehoff H, Hartmann K, Fischer A. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet Rec* 2008 May;162(19):618–22.
 - 64.Curiel TJ, Perfect JR, Durack DT. Leukocyte Subpopulations in Cerebrospinal Fluid of Normal Rabbits. *Lab Anim Sci* 1982 Dec;32(6):622–4.
 - 65.Miller BL, Goldberg MA, Heiner D, Myers A. Cerebral Cysticercosis: An Overview. *Bull Clin Neurosci* 1983;48:2–5.
 - 66.Silva MA, Barcelos EV, Junior ACA, Generoso D, Aldá MA, Batah SS, et al. Higher Concentration of Taenia Antigens in the CSF is Related to Slight Ventricle Enlargement and Periventricular Neuronal Decrease in Young Rats. *Brazilian Neurosurgery*. 2020;Epub ahead of print.
 - 67.Vistelle R, Wiczewski M, Aurousseau M. Continuous sampling of cerebrospinal fluid in the conscious rabbit. *Brain Res Bull* 1989 May;22(5):919–22.
 - 68.Li Y, Zhang B, Wen W, Liu S, Hao D, Liu M, et al. The comparison of three methods of drawing cerebrospinal fluid in rabbit. *J Neurosci Methods* 2012 Aug;209(2):398–402.
 - 69.Anselmi C, Dias S, Martorell J, Navarro M, Espada Y, Novellas R. Ultrasonographic anatomy of the atlanto-occipital region and ultrasound-

- guided cerebrospinal fluid collection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Radiol Ultrasound 2018 Mar;59(2):188–97.
70. Renard D, Thouvenot E. CSF RBC count in successful first-attempt lumbar puncture: the interest of atraumatic needle use. Neurol Sci 2017 Dec;38(12):2189–93.
 71. Perry S, Barnes J, Allan A. Performing and interpreting a lumbar puncture. Br J Hosp Med (Lond) 2018 Dec;79(12):C183–7.
 72. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. J Neurol 2012 Aug;259(8):1530–45.
 73. Baer ET. Post-Dural Puncture Bacterial Meningitis. Anesthesiology 2006 Aug;105(2):381–93.
 74. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. Expert Rev Anti Infect Ther 2011 Jan;9(1):123–33.
 75. Webb CM, White AC Jr. Update on the Diagnosis and Management of Neurocysticercosis. Curr Infect Dis Rep 2016 Dec;18(12):44.
 76. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcia M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. PLoS Negl Trop Dis 2020 Apr;14(4):e0008005.
 77. Souza AJS, Milhomem AC, Rezende HHA, Matos-Silva H, Vinaud MC, Oliveira MAP, et al. *Taenia crassiceps* antigens induce a Th2 immune response and attenuate injuries experimentally induced by neurotoxoplasmosis in BALB/c mice. Parasitol Int 2018 Feb;67(1):16–22.
 78. 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 Apr 9:1–16. Online ahead of print.

9. Artigo Científico em inglês

Experimental model of extraparenchymal Neurocysticercosis in rabbits with *Taenia crassiceps* leading to significant CSF and hydrodynamic changes

Introduction

Neurocysticercosis (NCC) is a highly prevalent disease worldwide, especially in developing countries with favorable social, economic and cultural conditions to maintain it in endemic levels, but also reported in developed nations as a result of imported cases.^{1,2,3} The disease leads to a significant social and public health impact due to the high morbidity and mortality associated: 5 million people suffer from epilepsy secondary to NCC, and the World Health Organization estimates that 50 thousand deaths are related to NCC annually.^{4,5}

Humans are usually the definitive host in the life cycle of *Taenia solium*, presenting the disease called taeniasis. However, in case of eggs ingestion, there is an inversion in the life cycle, so the parasite develops into cysticercus, which lodges in the CNS and leads to NCC.^{3,6} The parenchymal form of the disease occurs when the cysticercus is located into the brain tissue, leading to a local reaction and most of the times being destroyed, commonly with no symptoms or presenting with seizures. In the extraparenchymal form, however, when the parasite is located in the cerebrospinal fluid (CSF) compartments, the inflammatory reaction to the CSF is usually more dramatic and associated to severe symptoms including hydrocephalus and intracranial hypertension in up to 72% of the cases and high rates of morbidity and mortality.⁷

Experimental models of NCC are crucial for allowing a better understanding of the disease and thus optimizing therapy. The initial studies used *Mesocystoides corti* as parasite, however, more recently *Taenia crassiceps* has been used more often, and has proven to be easy to handle and less invasive to the brain tissue.^{8,9,10} Many different animals also have been used as hosts during the experiments, including rodents, monkeys and porcines.¹⁰⁻¹³ Only one study chose rabbits as hosts, but the authors did not induce NCC, and inoculated non-viable parts of cysticercus instead.¹⁴ Most of the studies also focused on the less morbid form of the disease: parenchymal NCC. A model of the extraparenchymal form using *T. crassiceps* in rats was recently developed by our group.⁸ In the present study, we intended to further study this model by injecting cysts or antigens of *T. crassiceps* into the subarachnoid space of rabbits, and aimed to study the CSF parameters and changes in the central nervous system in this model.

Methods

Overall, 39 young male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) aging 4–6 weeks old were selected and divided into two groups: 20 in group 1 (cysts) and 19 in group 2 (antigens). The experiments were conducted following the resolutions and after approval of the local ethical committee in animal research. The animals in group 1 were inoculated with 50 small viable cysts of *T. crassiceps* into their cisterna magna via a suboccipital puncture with a 22G needle under sedation and sterile technique, while in group 2, instead of cysts, 0.6mL of a solution containing *T. crassiceps* antigens was injected under same technique (Figure 2). To prepare the solution, cysts were collected and sonicated, in order to rupture the membranes and homogenize the mixture. All cysts used in this study were collected from the peritoneal cavity of mice (*M. musculus*) belonging to a project for the maintenance and replication of strains in our institution. The animals were kept in individual 0.28m² cages in our institution bioterium, with food and water *ad libitum*, in a room with controlled temperature.

The rabbits were observed for a total of 6 months, with biweekly CSF sample collection in the first two months, and then monthly via a suboccipital puncture for laboratorial analysis. To decrease the chances of blood contamination, the samples were collected in three different tubes, and preferentially the last tube was analyzed. The following parameters were assessed: cell count and differential, protein concentration and glucose. Immediately before the inoculations (T0), a first CSF sample was collected, considered as control in this study for comparison to the following samples (Figure 1). For all procedures, including the inoculations and CSF sample collection, the rabbits were sedated with ketamine (30mg/kg), xylazine (2–5mg/kg) and acepromazine (0,05–0,01mg/kg).

On the last month of observation, MRI was done to search for cysts, and study the ventricles and cisterns. Euthanasia was then performed with triple of the anesthetic doses used for sedation, followed by cardiac perfusion with normal saline 0,9% and neutral buffered formalin 10% to remove the brain blood content and fixation, craniectomy and brain removal. After inspection, the brains were fixed in formaldehyde 10% for 24h, and then a 3mm coronal slice was performed on the optic chiasm, in order to be processed for paraffin section preparation. The MRI images were analyzed using the software ITK-Snap for manual volumetry of ventricles and quadrigeminal cisterns. For statistical analysis, software SAS for Windows version 9.4 was used, and a significance level of 0.05 was fixed.

Results

From the initial 39 rabbits who received cysts (group 1, $n_i=20$, $n_f=13$), or antigens (group 2, $n_i=19$, $n_f=12$) of *T. crassiceps* through punctures to the cisterna magna, 25 survived for 6 months and were included in the final analysis. The other 14 animals died from overdose during the anesthetic procedure or diarrhea. Overall, 198 successful suboccipital punctures with CSF collection were performed. Only one animal developed bacterial meningitis following a puncture in the last month of observation, and had the final CSF sample removed from the analysis.

The initial cell counting average before inoculation in the group 1 was 1.0 (± 0.88) cell/ μ L, leaping to 1405.13 (± 590.08) cells/ μ L two weeks after the cysts injection and then gradually dropping over the following months, reaching low levels in the third month, but without returning to very low numbers as compared to the control. In group 2, the initial cellularity was 7.5 (± 10.88) cell/ μ L, with a sharp increase to 76.5 (± 45.9) cells/ μ L in two weeks, and a more rapid decrease over the following weeks when compared to the first group (Figure 3).

The differential analysis showed that in both groups the percentage of lymphocytes present in the CSF had a significant increase after the inoculations with no recovery during the rest of the observational period (Figure 4).

Regarding the protein concentration, a similar pattern to the cell count was seen in the group 1. The numbers sharply increased from 25.82 (± 8.26) mg/dL to 77.03 (± 40.43) mg/dL in two weeks, followed by a gradual decrease but with abnormally elevated levels in the last two months (Figure 5). In group 2, however, there was no statistically significant fluctuation, except for the third month, when a peak coincides with a high number of CSF traumatic taps (data not shown).

MRI findings (Figure 6) revealed a high frequency of hydrocephalus (64.3% of the animals in group 1 and 55.6% in group 2) and enlarged quadrigeminal cistern (respectively, 92.9% and 66.7%). In a comparison between both groups, the median cisternal volume in group 1 (186.9) was statistically higher than the median in group 2 (111.0), $p=0.007$. The other MRI data did not reveal differences with statistical significance. No cysts were seen in the images.

After dissection and removal of the rabbit brains, no cysts were found. The most common histopathological finding was a mild lymphocytic meningitis, present in 70% of the animals (Figure 7).

Discussion

The previous studies in experimental NCC focused mainly in the parenchymal form of the disease, and to date, no other group analyzed the CSF changes in extraparenchymal animal models.^{9,10,12} Only one previous study used rabbits as hosts and inoculated *T. solium* destroyed products into rabbits CNS.¹⁴ Furthermore, *T. crassiceps* has been used before in rabbit experimentation in an ocular cysticercosis model, but its injection into rabbits CNS has never been reported.¹⁵ This is the first study to successfully inoculate live *T. crassiceps* cysts into the CNS of rabbits.

The present model has been extensively studied in rats by our group in recent papers and has proven to be effective in reproducing NCC with a significant inflammatory reaction leading to a chronic hydrocephalus in those animals.^{8,11,16} The study of CSF in this model, however, although possible is not feasible in rats due to a small cisterna magna without enough volume to collect samples for laboratorial analysis. In the current work we showed that the same model is possible to be done in rabbits, allowing for multiple CSF collections in a safely manner. To note, no cysts were found during the brain removal, and future studies using early MRI or a shorter observational period could clarify for how long the parasite remains viable in rabbits CNS.

We found a significant inflammatory reaction in the CSF of the studied animals, with a cell count peak 200 times and a protein concentration 2.4 times higher than the superior limit reported as normal for rabbits in the group that received cysts.^{17,18} This inflammation had a chronic presentation, since even in the late phases of observation the numbers were still superior than the normal range, and the cell pattern was persistently changed to a lymphocytic predominance. Such data are in agreement with the histopathological and MRI findings, respectively a lymphocytic meningitis and hydrocephalus and enlarged cisterns in most animals, and also with what happens in humans. Chavarría et al. reported in 2005 that patients with highly inflammatory CSF develop more severe symptoms.¹⁹ The previous studies with the current model in rats also found the presence of a lymphocytic infiltrate and hydrocephalus, although it is hard to compare different studies, it seems to have been more severe in rats, and at the end of the observational period, the cysts were still present in many animals.^{8,11,16}

Our complication rate was low. Only one animal developed bacterial meningitis following one out of 198 punctures in total (0.5%). This is in accordance with what is reported by other authors, and reaffirms the rareness of this specific complication.^{20,21} CSF collection in rabbits has been extensively discussed in the literature, and the technique varies from burr-hole for the insertion of a draining system, lumbar puncture or suboccipital puncture, the

latter being considered the easiest and fastest, allowing for multiple collections.^{22,23} The use of ultrasound to guide the puncture has also been reported to help locating the cisterna magna, although it requires one extra step during the procedure.²⁴ Another discussion is regarding the preferred anesthesia. In the current study we opted in favor of a mild sedation without oxygen supply, and out of 39 animals and a total of 198 procedures, 7 died during the anesthetic induction. Jass et al. reported the use of orotracheal intubation to protect the airway, what could help prevent respiratory failure, but adds an invasive procedure, making it more complicated in a large series with multiple CSF collections.¹⁷

In conclusion, rabbits have shown to be feasible hosts in this model of extraparenchymal NCC, developing significant CSF changes, a gradually developed hydrocephalus and cisterns enlargement, and allowing for multiple suboccipital punctures for CSF collection.

References

1. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop* 2003 Jun;87(1):43–51.
2. Mullins C, Muniz JA, Sandoval H, Padilla O, Ramos-Duran L. Neurocysticercosis of the fourth ventricle associated with hydrocephalus. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2017 Jul;30(3):365–7.
3. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC Jr, et al. Neurocysticercosis: Neglected but Not Forgotten. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 May;6(5):e1500.
4. Center for Disease Control. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. *MMWR Recomm Rep* 1993 Dec;42:1–38.
5. Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Cavalcanti MG, Alencar CH, Heukelbach J. Reprint of “Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death”. *Acta Trop* 2017 Jan;165:170–8.
6. de Lange A, Mahanty S, Raimondo JV. Model systems for investigating disease processes in neurocysticercosis. *Parasitology* 2019 Apr;146(5):553–62.
7. Marcin Sierra M, Arroyo M, Cadena Torres M, Ramírez Cruz N, García Hernández F, Taboada D, et al. Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLoS Negl Trop Dis* 2017 Jun;11(6):e0005646.
8. 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 Jan;33(1):119–23.

9. 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 Jan;162(2):995–1002.
10. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VB, Vinaud MC, et al. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr* 2012 Apr;70(4):287–92.
11. 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 Dec;30(12):819–23.
12. 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 Aug;185(8):2259–68.
13. 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. *ScientificWorldJournal* 2014 Dec;2014:248049.
14. García de Llano CA, Mateos JH, Rivas Hernández A. Inflammatory reaction in neurocysticercosis in experimental studies in rabbits. *Arch Invest Med (Mex)* 1989 Jan–Mar;20(1):61–8.
15. Hamamoto Filho PT, Fogaroli MO, Oliveira MAC, Oliveira CC, Batah SS, Fabro AT, et al. A Rat Model of Neurocysticercosis-Induced Hydrocephalus: Chronic Progressive Hydrocephalus with Mild Clinical Impairment. *World Neurosurg* 2019 Dec;132:e535–e544.
16. Cárdenas F, Plancarte A, Quiroz H, Rabiela MT, Gómez-Leal A, Correa D, et al. *Taenia Crassiceps*: Experimental Model of Intraocular Cysticercosis. *Exp Parasitol* 1989 Nov;69(4):324–9.
17. Jass A, Matiassek K, Henke J, Küchhoff H, Hartmann K, Fischer A. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet Rec* 2008 May;162(19):618–22.
18. Curiel TJ, Perfect JR, Durack DT. Leukocyte Subpopulations in Cerebrospinal Fluid of Normal Rabbits. *Lab Anim Sci* 1982 Dec;32(6):622–4.
19. Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 2005 Sep;116(3):271–8.
20. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol* 2012 Aug;259(8):1530–45.
21. Baer ET. Post-Dural Puncture Bacterial Meningitis. *Anesthesiology* 2006 Aug;105(2):381–93.

22. Vistelle R, Wiczewski M, Aurousseau M. Continuous sampling of cerebrospinal fluid in the conscious rabbit. Brain Res Bull 1989 May;22(5):919-22.
23. Li Y, Zhang B, Wen W, Liu S, Hao D, Liu M, et al. The comparison of three methods of drawing cerebrospinal fluid in rabbit. J Neurosci Methods 2012 Aug;209(2):398-402.
24. Anselmi C, Dias S, Martorell J, Navarro M, Espada Y, Novellas R. Ultrasonographic anatomy of the atlanto-occipital region and ultrasound-guided cerebrospinal fluid collection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Radiol Ultrasound 2018 Mar;59(2):188-97.

Figures

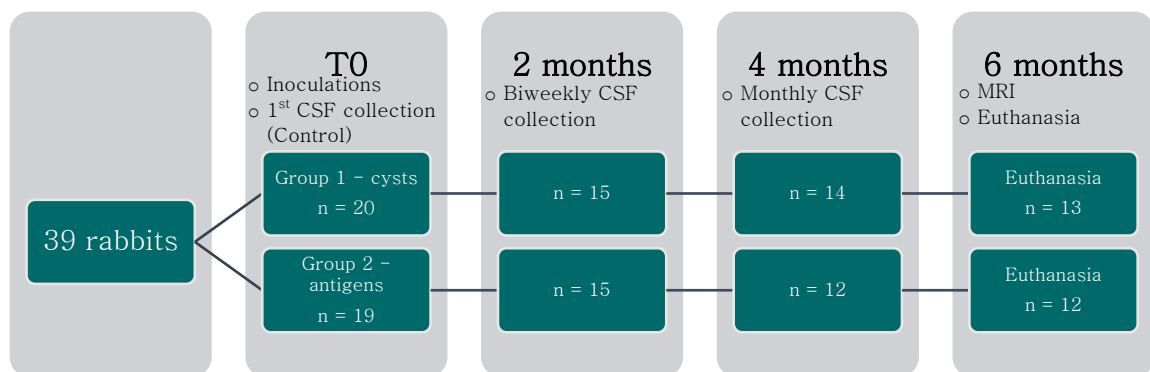


Figure 1: Design of experiments. MRI: Magnetic resonance imaging. CSF: Cerebrospinal fluid.

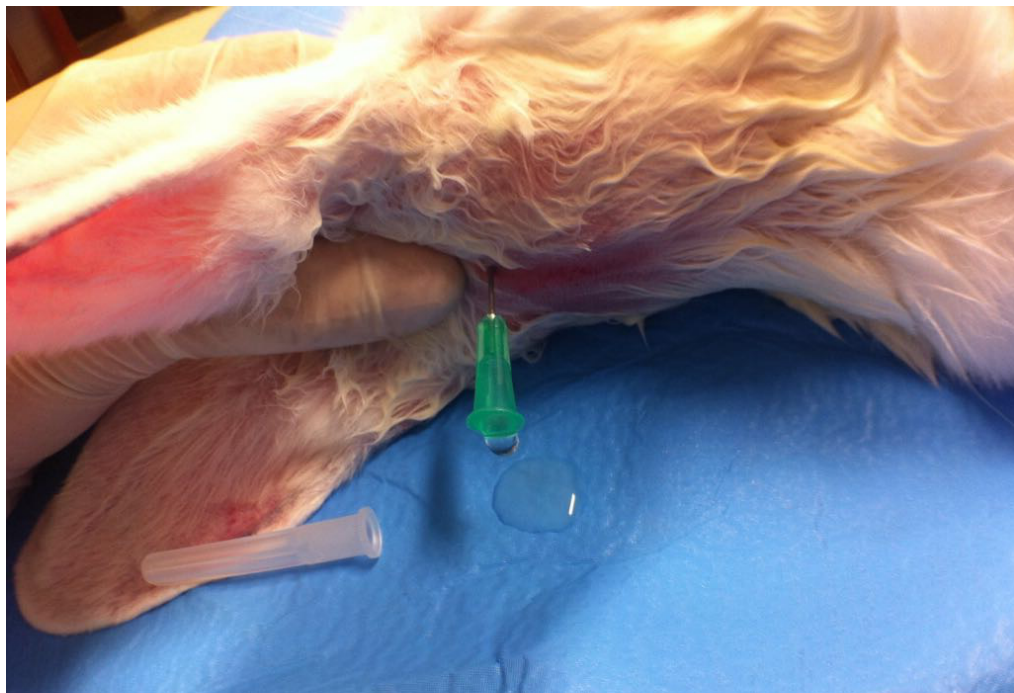


Figure 2: Picture illustrates a suboccipital puncture to the cisterna magna. Note the spontaneous CSF drainage through the needle.

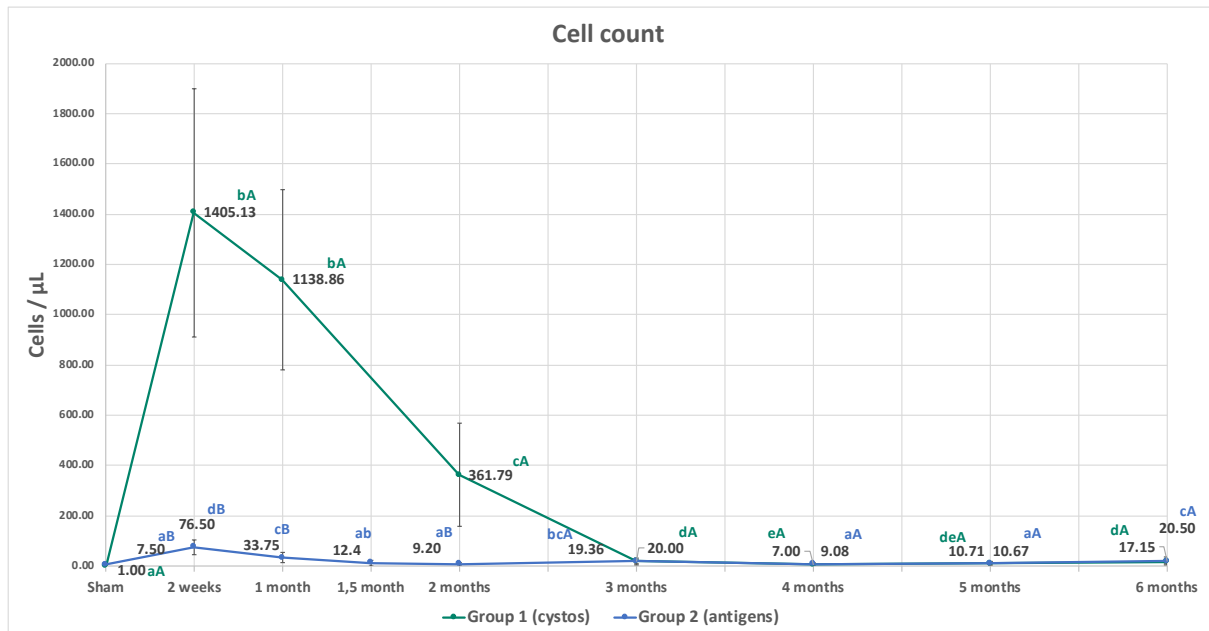


Figure 3. Cell count fluctuation over the observational period. The animals in group 1 had a sharp increase two weeks after the inoculations, with a gradual decrease over the following months, while in group 2 the peak was smaller and the recovery was faster. Small letters correspond to statistical comparisons within the same group and capital letters, different groups. Different letters mean statistically significant differences.

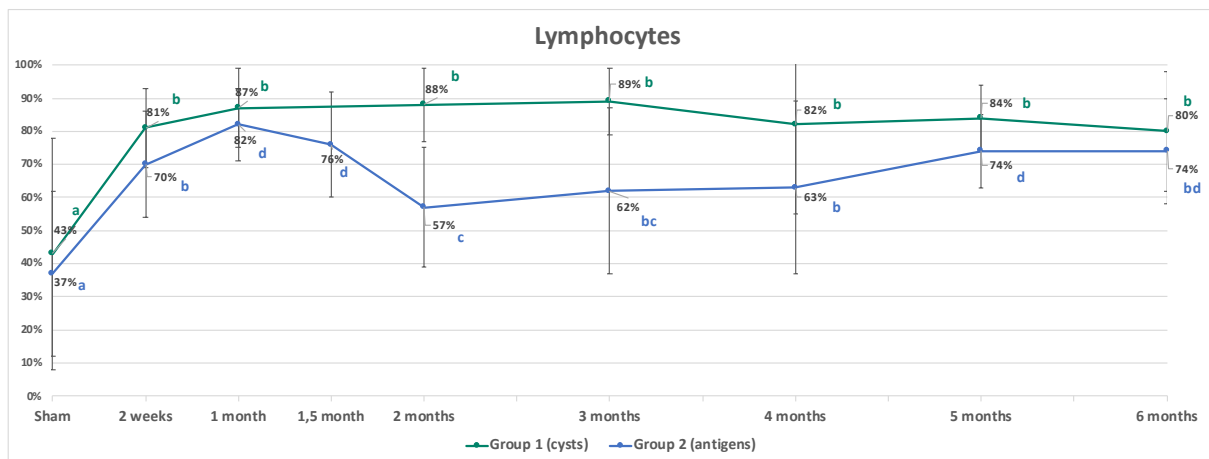


Figure 4. Mean percentage of lymphocytes in the differential cell analysis showing a predominance of this cell type after the inoculations in both groups.

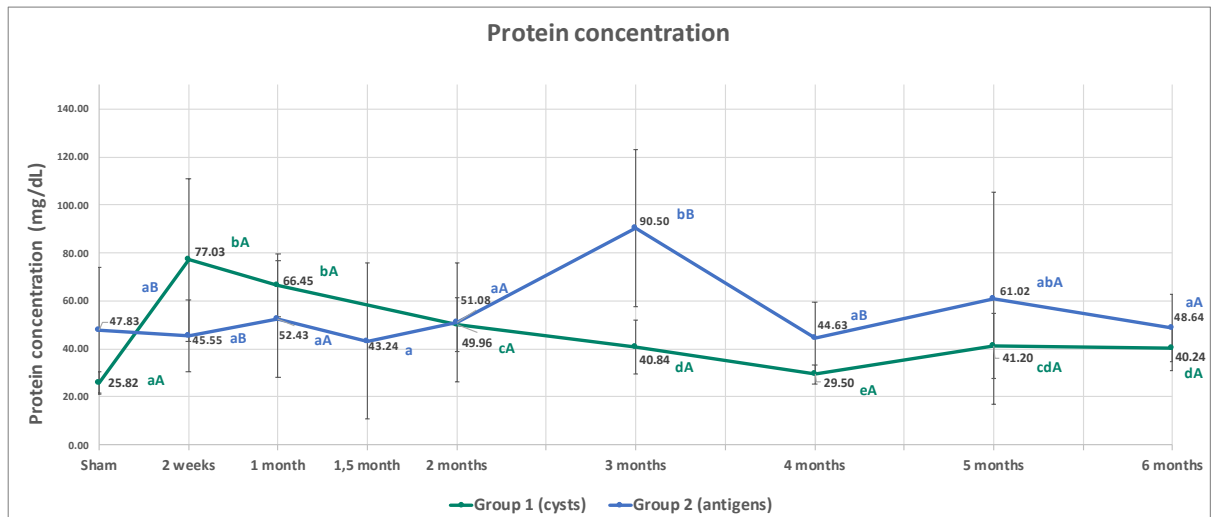


Figure 5. Mean concentration of protein in CSF samples showing a similar pattern to the cell count fluctuation in group 1.

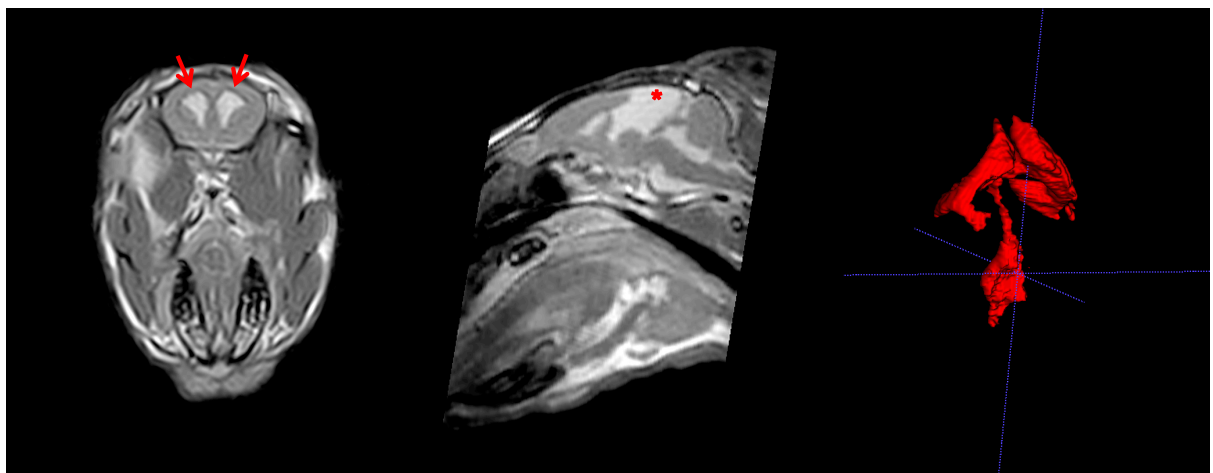


Figure 6: MRI images showing a coronal view in one of the rabbits on the left with evident hydrocephalus (arrows), and a sagittal view on the center showing enlarged quadrigeminal cistern (asterisk). On the right, a 3D reconstruction of the ventricles using the software ITK-Snap.

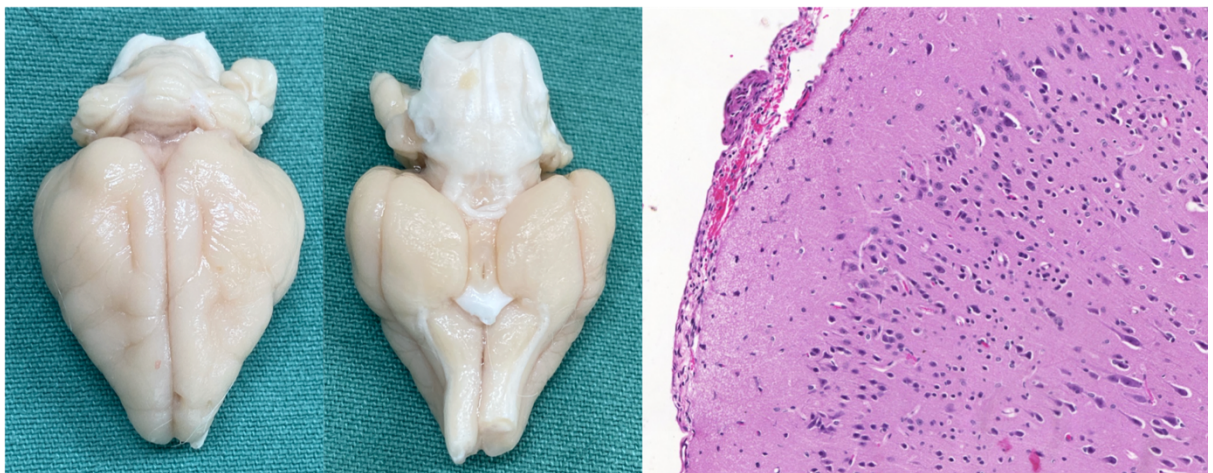


Figure 7: On the left, macroscopic aspect of a rabbit brain shortly after cardiac perfusion and removal. On the right, brain tissue stained with hematoxylin and eosin seen under microscope showing a mild lymphocytic meningitis.

10. Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





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

CERTIFICADO Nº 1247/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo de alterações bioquímicas, imunológicas e de estresse oxidativo do líquido amniótico em modelo de neurocisticercose experimental"**, conduzida pelo Pesquisador: Aderaldo Costa Alves, Orientado pelo Prof. Dr. Marcos Antonio Zanini, com a participação do Colaborador: Pedro Tadão Hamamoto Filho, registrada com o nº 1247/2017, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e 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 de 30 de novembro de 2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/10/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Coelhos – Padrão Genético de Botucatu
Nº de animais	20
Idade/Peso	1 meses – 1,5kg
Sexo	10 Machos / 10 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB



Graziela Nogueira Bertani
Secretária Responsável
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA



Prof. Dr. Guilherme Antonio Moreira de Barros
Presidente
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





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

CERTIFICADO Nº 1321/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Caracterização do padrão inflamatório linfocitário num modelo experimental de neurocisticercose extraparenquimatosa"**, conduzido pelo Pesquisador: Aderaldo Costa Alves Junior – Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Zanini – Coorientador: Prof. Dr. Pedro Tadão Hamamoto Filho, registrada com o nº 1321/2019, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 25 de setembro de 2019.

Obs.: Utilizará material armazenado de Projetos aprovados pela CEUA Sob nº 1038/2013 E 1148/2015.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01 de janeiro de 2022
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	ZERO
Idade/Peso	06
Sexo	Masculino
Origem	-



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

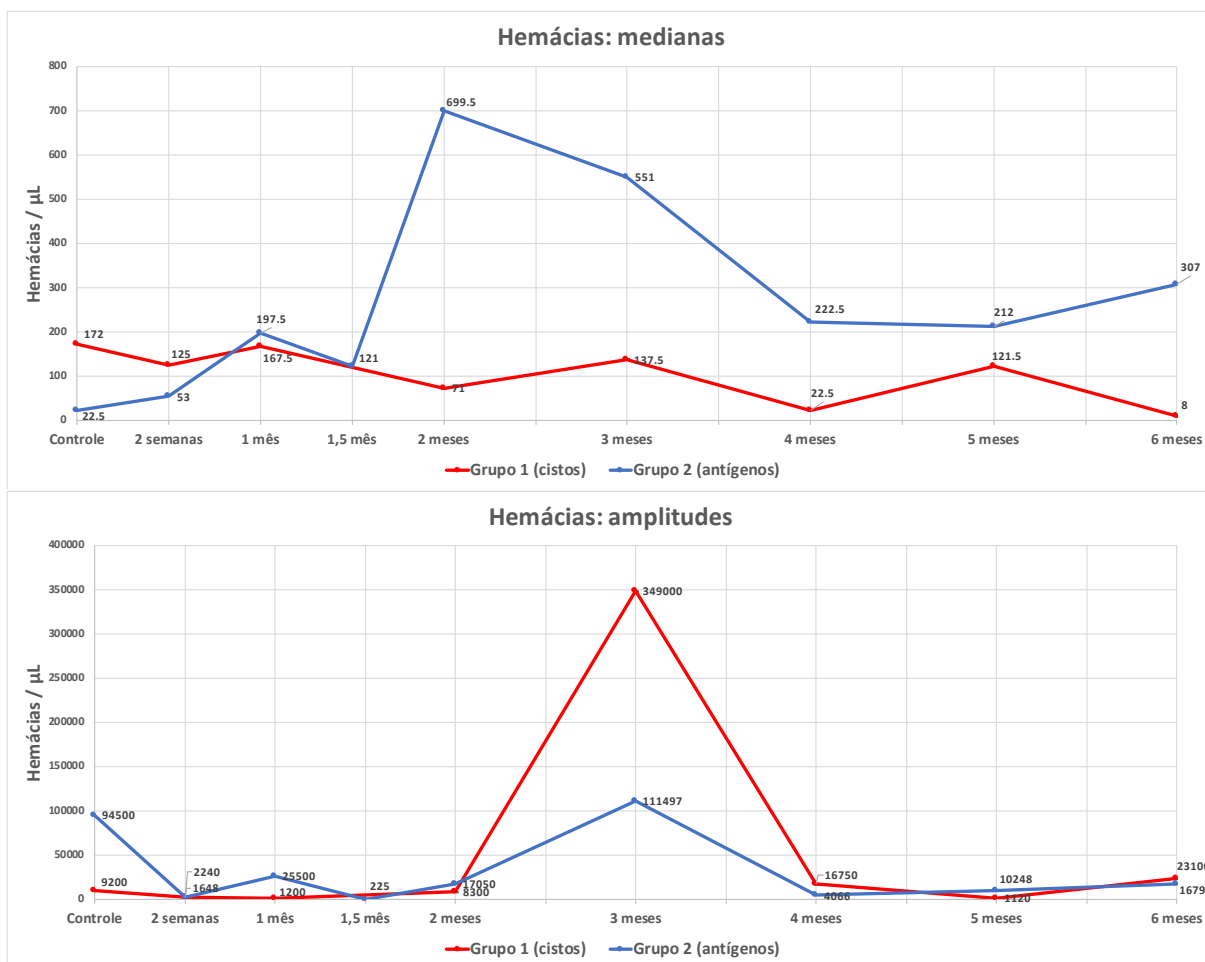


Profa. Assistente Berna Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br

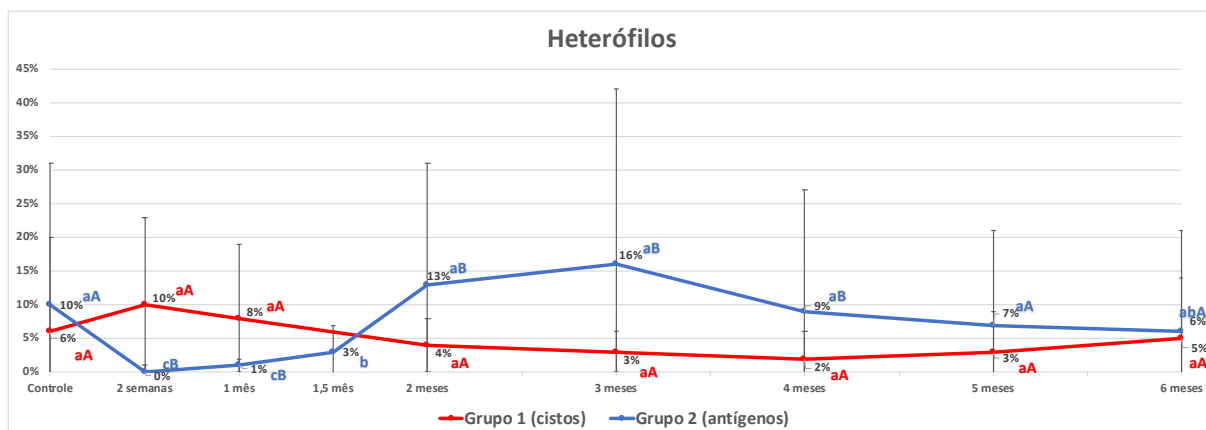
11. Anexos

Anexo I: Hemácias



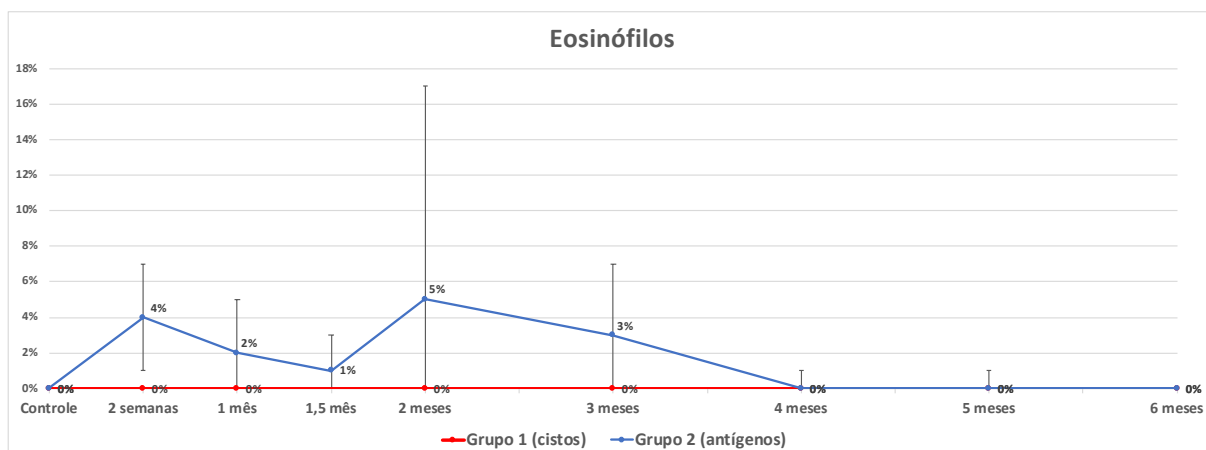
Anexo I. Gráficos ilustrativos das medianas e amplitudes de hemácias por μL de líquido durante o período de observação, indicativos de acidentes de punção. No gráfico superior, de medianas, ficam evidentes as maiores incidências de acidentes ocorridos no segundo e terceiro meses para o grupo 2. No gráfico inferior, observam-se as amplitudes em cada momento, com picos no terceiro mês.

Anexo II: Heterófilos



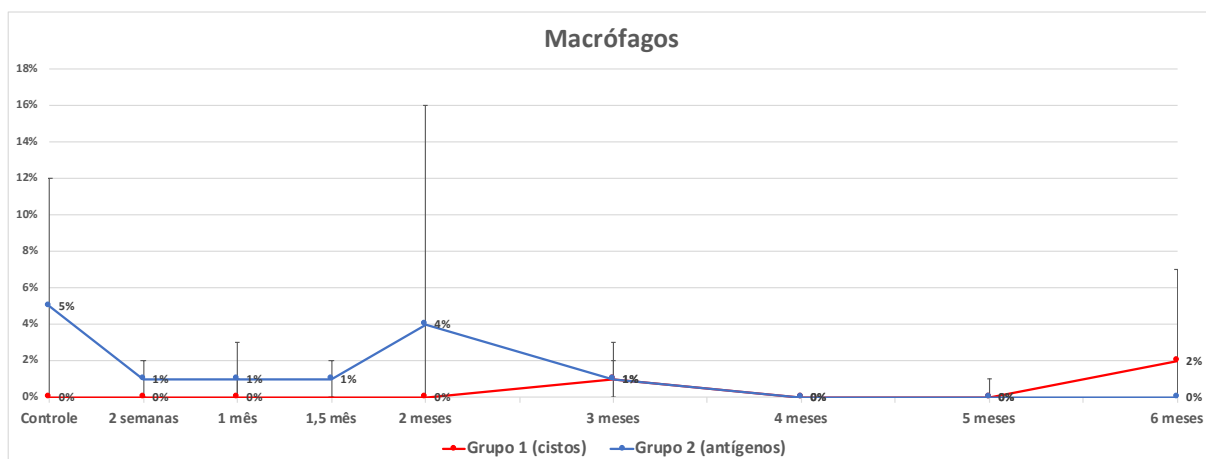
Anexo II. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de heterófilos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação. O grupo 1 apresentou estabilidade nas taxas de heterófilos, enquanto que, no grupo 2, os picos coincidem com a maior presença de hemácias no líquido, indicativos de acidentes de punção. Letras minúsculas correspondem a comparações estatísticas dentro de um mesmo grupo em momentos distintos, e letras maiúsculas, entre os dois grupos num mesmo momento, sendo letras diferentes referentes à presença de significância estatística. Valores expressos em percentuais médios. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. Teste estatístico: ANOVA de medidas repetidas.

Anexo III: Eosinófilos



Anexo III. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de eosinófilos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação. Não houve variações estatisticamente significativas para esta variável. Ao todo, 15,5% das amostras de LCR coletadas apresentaram presença de eosinófilos. Valores expressos em percentuais médios. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. O teste estatístico ANOVA de medidas repetidas não revelou diferenças estatisticamente significativas.

Anexo IV: Macrófagos



Anexo IV. Gráfico ilustrativo da porcentagem média de macrófagos na contagem diferencial celular no LCR dos coelhos durante o período de observação. Não houve variações estatisticamente significativas para esta variável. Valores expressos em percentuais médios. Barras verticais correspondem aos respectivos desvios-padrão. O teste estatístico ANOVA de medidas repetidas não revelou diferenças estatisticamente significativas.