**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**ALINE DE ARAÚJO FREITAS**

# Caracterização da resposta inflamatória local e sistêmica em camundongos infectados com cisticercos de *Taenia crassiceps* no subcutâneo

Orientador:
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior
Co-orientador:
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

**Dissertação de Mestrado**

Goiânia-GO, 2010

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

**ALINE DE ARAÚJO FREITAS**

# Caracterização da resposta inflamatória local e sistêmica em camundongos infectados com cisticercos de *Taenia crassiceps* no subcutâneo.

Orientador:
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior
Co-orientador:
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Dissertação submetida ao PPGMTSP/UFG como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre na área de concentração em Imunologia

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de amparo á Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) processo número 200710267000056.

Goiânia-GO, 2010

Este trabalho é dedicado aos meus pais: Dalvina e Dimas, pelo amor, dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos de minha vida, e também pela incontestável confiança que depositam em mim, o que me incentiva buscar sempre o melhor, as palavras são incapazes e insuficientes, para expressar o significado e a importância que vocês têm em minha vida.

À minha irmã Dnise, pela confiança e cumplicidade, que me estimulou e fortaleceu, na busca de novas conquistas.

Aos meus avós: Maria e João (*in memoriam*) pela confiança, amor e orgulho que sempre recebi de vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Deus , pela vida que me concede a cada amanhecer, pela saúde, pela persistência, pela inteligência, pela esperança, pela família, pelos amigos, enfim, pela felicidade, por inúmeros dons que são doados não somente a mim, mas a todos, cujos dons me fazem transpor com confiança, os obstáculos que aparecem a cada novo dia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, por ter me aceitado em seu laboratório e ter me dado a chance de conhecer o mundo da pesquisa. Pela enorme paciência e disposição que sempre teve ao me ensinar, por estar sempre presente, mas ao mesmo tempo ausente em alguns momentos, para que eu pudesse crescer com meus próprios erros e acertos. Pelas palavras animadoras, que sempre me encorajavam a continuar. Antes de orientador, um grande amigo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, pela inestimável contribuição para a realização deste trabalho. Pela permissão de utilizar seu laboratório e os reagentes, sem os quais este trabalho não se realizaria. Pela paciência e prontidão ao me ensinar desde contas matemáticas, pontuações gramaticais (que por sinal ainda não aprendi muito bem), a mecanismos imunológicos.

Ao Prof Dr. Vicente Raul Chavarria Irusta, pela permissão em realizar análises hematológicas e bioquímicas, no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Araújo Jorge, e pela contribuição científica dispensada.

À minha grande amiga Vânia Beatriz Lopes Moura, pelo companheirismo, alegria e presença em muitos momentos. Pela enorme paciência ao me ensinar tudo no laboratório, pela prontidão ao me ajudar fazer inóculo e eutanásia de camundongos, enfim, por me ajudar a executar quase todos os procedimentos necessários para a realização deste trabalho. Pelas conversas, pelas risadas, pelas farras, uma grande amiga e colega de pós-graduação que tornou esses dois anos mais agradáveis e divertidos.

Ao meu querido Paulo, pelo amor, companheirismo, compreensão, apoio e muita paciência. Pelas palavras estimulantes, que me fazem seguir em frente com confiança, e pelos momentos agradáveis que compartilhamos e que fazem os meus dias mais felizes.

Aos meus amigos do laboratório de Patologia, Vânia, Hidelberto, André, Bruno, Diego e Juliana pelo companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação de outros laboratórios, Regiane, Ludimila, Bruna Coelho, Alex, Lucas, Keila, Rodrigo, Natália, Carolina Miguel, Carolina Aguiar, Aline Barbaresco, Míriam, Ana Flávia, Tatiane Luiza, Bruna Daniela, Michele, Eduardo, Lucas Batista, Clayson, Mayara, Walki, Bruno e Danilo pela amizade, convivência e valorosos momentos de troca de experiências e conhecimentos.

À todos os professores da Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG, pela enorme contribuição para o crescimento de meu conhecimento científico.

Às professoras Dr$^{a}$ Eliza Duarte e Dr$^{a}$ Patrícia Nagib , pela amizade e pela disposição em me ajudar com a imunoistoquímica, por me incentivarem a persistir a cada dia na busca de uma imunoistoquímica melhor.

À Prof$^{a}$ Dr$^{a}$ Fátima Dias pelo consentimento em utilizar seu laboratório, e pela colaboração intelectual durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof$^{a}$ Dr$^{a}$ Mara também pelo consentimento em utilizar seu laboratório, e pela contribuição científica dispensada.

À Prof$^{a}$ Dr$^{a}$ Marina, pela amizade e prontidão em me ajudar com as análises estatísticas e pela grande contribuição intelectual para a realização deste trabalho.

À minha banca de qualificação pela valorosa e importante contribuição científica, Fátima Ribeiro Dias, Luis Augusto Brito, Ana Maria de Castro, Mara Silvia Carvalhaes, Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo e Marina Clare Vinaud.

Ao Programa de Pós-Graduação e Medicina Tropical e Saúde Pública que viabilizou a realização deste trabalho

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, por ter oferecido condições necessárias para a realização deste trabalho.

Aos funcionáros do IPTSP/UFG Kariny, José Clementino, Fernando, Almir, Divina, Maria Aparecida, pela atenção e competência.

À todos os funcionários da limpeza do IPTSP/UFG por sempre manter nosso ambiente de trabalho limpo e agradável

Aos funcionários do Biotério do IPTSP/UFG, Iraci, Marli, Eunice, Gilda e Raimundo, pela limpeza do biotério e pela convivência.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Clínica do Hospital Araújo Jorge, Elverth, Terezinha e Catarina, pela grande prontidão ao realizar as análises e pela amizade que cultivamos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo financiamento que possibilitou a compra de reagentes e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas e figuras.....10
Lista de abreviaturas.....12
Resumo.....14
Abstract.....15
Introdução.....16
1. Teníase e cisticercose.....17
1.1 *Taenia solium* e *Taenia saginata* .....17
1.1.1 Ciclo biológico e modo de transmissão.....18
1.2 *Taenia crassiceps* .....21
1.2.1 Epidemiologia.....23
2. Modelo de cisticercose experimental.....23
3. Introdução à imunologia.....25
3.1 Imunologia aos helmintos.....31
3.2 Imunologia da cisticercose experimental por *T. crassiceps*.....35
Objetivos.....42
Objetivo geral.....43
Objetivos específicos.....43
Material e Métodos.....44
1. Animais.....45
2. Manutenção do ciclo experimental e inóculo dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO com cisticerco de *Taenia crassiceps* .....45
3. Análise hematológica.....46
4. Análise anatomopatológica.....46
5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação de IFNγ, IL-4 e IL-12p40.....47
6. Análise dos tipos celulares por imunoistoquímica.....48
7. Análise estatística.....50
Resultados.....51
1. Análise hematológica.....52
2. Análise anatomopatológica.....52

3. Detecção de células CD301+ no subcutâneo infectado com cisticercos de T. crassiceps.....64
4. Concentração sérica das citocinas IFNγ, IL-4 e IL-12p40.....69
Discussão.....73
Conclusão .....80
Referências bibliográficas.....81
Apêndice.....94
Anexos.....97

## Lista de tabelas e figuras

Figura 1. Ciclo de vida da *Taenia solium*.....20
Figura 2. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*.....22
Figura 3 Aspectos macroscópicos de cisticercos de *Taenia crassiceps*..... 24
Figura 4. Sistema imune humano.....27
Figura 5. Diferenciação dos perfis de células T.....30
Figura 6. Fatores de transcrição e diferenciação dos perfis de células Th1 e Th2.....31
Tabela 1. Análise dos processos patológicos gerais presentes no subcutâneo de camundongos da linhagem C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO infectados com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....55
Figura 7. Macroscopia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO aos sete e 30 dias após a infecção.....56
Figura 8. Macroscopia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO aos 60 e 90 dias após a infecção.....57
Figura 9. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO aos sete dias após a infecção.....58
Figura 10. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 30 dias após a infecção.....59
Figura 11. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 60 dias após a infecção.....60
Figura 12. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 90 dias após a infecção.....61
Figura 13. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos sete e 30 dias após a infecção.....62
Figura 14. Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 60 e 90 dias após a infecção.....63
Figura 15. Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos sete dias após a infecção.....65

Figura 16. Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 30 dias após a infecção.....66
Figura 17. Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos 60 dias após a infecção.....67
Figura 18. Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ - KO aos sete dias após a infecção.....68
Figura 19. Concentração de IFNγ no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....70
Figura 20. Concentração de IL-4 no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....71
Figura 21. Concentração de IL-4 no soro de camundongos C57BL/6 - IFNγ - KO infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....71
Figura 22. Concentração de IL-12p40 no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....72
Figura 23. Concentração de IL-12p40 no soro de camundongos C57BL/6 - IFNγ - KO infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....72
Tabela 2. Hemograma de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps* aos 07, 30, 60 e 90 dias após a infecção.....93
Tabela 3. Hemograma de camundongos C57BL/6 KO - IFNγ infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps* por 07, 30, 60 dias após a infecção.....94
Figura 24. Esquema da resposta imune no modelo de cisticercose subcutânea experimental em camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ -KO.....98

## Lista de abreviaturas

μL- Microlitro

μm – Micrômetro

CD - Grupos de Diferenciação (do inglês, Cluster of Differentiation)

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

ELISA – Ensaio Imunoensimático (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

HE – Hematoxilina e Eosina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, human immunodeficiency vírus)

IFN γ– Interferon Gama

IFNγ - KO – Deficientes para o gene de Interferon Gama (do inglês, Interferon Gama)

IL – Interleucina

IgE – Imunoglobulina E

IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

MR – Receptor para Manose (do inglês, Manose Receptor)

NO – Óxido Nítrico (do inglês, Nitric Oxide)

ORF – Original de Raposas (do inglês, Original Fox)

PBS – Solução salina tamponada com fosfatos (do inglês, Phosphate Buffered Saline)

STAT4 - Ativador de Transcrição e Transdutor de Sinal do Tipo 4 (do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 4)

STAT6 - Ativador de Transcrição e Transdutor de Sinal do tipo 6 (do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 6)

T A – Temperatura Ambiente

TGFβ – Fator Transformador de Crescimento Beta (do inglês Transforming Growth Factor-beta)

Th1 – LinfócitoT auxiliar do tipo 1 (do inglês, T helper 1)

Th2 – LinfócitoT auxiliar do tipo 2 (do inglês, T helper 2)

Th17- Linfócito T auxiliar tipo 17 (do inglês T helper 17)

T reg – Linfócito T regulador (do inglês T regulatory)

TNFα - Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor-alpha)

UFG - Universidade Federal de Goiás

VCM – Volume Corpuscular Médio

## RESUMO

A forma larval de *Taenia crassiceps* tem sido empregada como modelo experimental da cisticercose humana, por possuir similaridades antigênicas com o cisticerco de *T. solium*. A cisticercose humana por *T. crassiceps* foi relatada em pacientes imunodeprimidos, e imunocompetentes. Devido ao fato de que a resposta imunológica frente a *T. crassiceps* ainda não está totalmente esclarecida, o presente estudo objetivou a caracterização da resposta inflamatória local e sistêmica em linhagens de camundongos C57BL/6 convencionais e deficientes do gene do IFNγ (IFNγ-KO) após a infecção subcutânea por cisticercos de *T. cracisseps*. Para tanto, foram avaliados o hemograma, as alterações anatomopatológicas no subcutâneo, a presença de macrófagos alternativamente ativados (células CD301+) e a dosagem sérica de citocinas (IFNγ, IL-12p40 e IL-4). Nenhuma das linhagens apresentou alteração no hemograma após infecção. Em ambas linhagens, foram observadas a formação de granulomas no sítio inflamatório, com presença de neutrófilos e macrófagos. No entanto, a reação granulomatosa foi mais precoce, intensa e com maior quantidade de colágeno na linhagens IFNγ-KO. As concentrações séricas de IFNγ, IL12p40 e IL-4 nos camundongos C57BL/6 convencional infectados aumentaram comparadas aos camundongos convencionais não infectados. Na linhagem IFNγ-KO, o aumento da concentração sérica de IL-4 foi observada devido à infecção, porém, a concentração desta citocina foi menor comparada com a outra linhagem. Foi observada também na linhagem C57BL/6 convencional, a presença de células CD301+ no início da infecção e, na linhagem IFNγ-KO, estas células estavam presentes no final da infecção. Em conclusão, a resposta imune dos camundongos C57BL/6 induzida por cisticercos de *T. crassiceps* pode ser caracterizada por um perfil misto Th1/Th2. A resposta mista é capaz de promover a destruição do parasito de maneira dependente de IFNγ, o que resulta em uma menor lesão e menor produção de colágeno. Na deficiência de IFNγ apresenta um perfil que tende para resposta imune Th2, com presença de clélulas CD301+ e aumento da produção de colágeno.

Palavras-chave: cisticercose subcutânea, inflamação granulomatosa, cisticercose experimental, resposta imune.

## ABSTRACT

The larval form of *Taenia crassiceps* has been used as an experimental model to human cysticercosis, because it has antigenic similarities with the *T. solium* cysticercus. The human cysticercosis by *T. crassiceps* has been reported in immunodepressed and immunocompetent patients. Due to the fact that the immune response to *T. crassiceps* is still unclear, the present study aimed to characterize the local and systemic inflammatory response of C57BL/6 wild-type and C57BL/6 IFNγ -Knockout (IFNγ-KO) mice strains after subcutaneous infection by *T. crassiceps* cysticercus. For this were evaluated the hemogram, the anatomopathological changes in the subcutaneous tissues , the presence of alternatively activated macrophages (CD301+ cells) and the serum cytokines concentration (IFNγ, IL-12p40 and IL-4). Neither of strains presented alterations on the hemogram after infection In both infected strains, it was observed granulomes formation on the inflammatory site with neutrophils and macrophages. However, the granulomatous reaction was more early, intense and with greater amount of collagen in infected IFNγ-KO. The serum concentrations of IFNγ, IL-12p40 and IL-4 in the infected C57BL/6 wild-type increased compared to the wild-type uninfected mice. In the infected IFNγ-KO, the increase of IL-4 serum concentration was observed due to the infection, however this cytokine concentration was lower compared with other infected strain. It was also observed in the C57BL/6 wild-type the presence of CD301+ cells at the beginning of the infection and, in the IFNγ-KO, these cells were present at the end of the infection. In conclusion, the immune response of C57BL/6 mice induced by *T. crassiceps* cysticercus can be characterized by mixed Th1/Th2 profile. The mixed response is able to promote the destruction of the parasites IFNγ-dependent, which results in a minor injury and lower collagen production. In IFNγ- deficient, there is a profile that tends towards the Th2 immune response, with the presence of CD301+ cells and increased collagen production.


Keywords: subcutaneous cysticercosis, granulomatous inflammation, experimental cysticercosis, immune response.

# *INTRODUÇÃO*

## 1.Teníase e cisticercose

### 1.1 *Taenia solium* e *Taenia saginata*

As parasitoses intestinais, ou enteroparasitoses, são geralmente ocasionadas por macroparasitas (helmintos) ou microparasitas (vírus, bactérias e protozoários) de distribuição universal, com uma maior prevalência e sintomatologia nos países subdesenvolvidos, atingindo 90% da população em condições sanitárias mais deficientes. A gravidade das parasitoses está relacionada à um aumento da resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos e a um número crescente de hospedeiros susceptíveis, sobretudo portadores de HIV/AIDS ( Vírus da imunodeficiência humana, do inglês, Human imunodeficiency virus / síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês, Aquired Immunodeficiency Syndrome) (Ferrari et al; 2004).

A freqüência de parasitoses intestinais em nosso país é sabidamente elevada, assim como nos demais países em desenvolvimento, sofrendo variações quanto à região, às condições de saneamento básico, ao nível sócio-econômico, ao grau de escolaridade, à idade e aos hábitos de higiene dos indivíduos que nela habitam (Machado et al*;* 1999).

Dentre os parasitos intestinais, os cestódeos *Taenia solium* e *Taenia saginata* são responsáveis pela teníase humana. O gênero *Taenia* pertence à família *Taenidae*, classe *Cestoidea* e ordem *Cyclophyllidea* (Rey, 2002). As respectivas formas larvais (*Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus bovis*) desencadeiam a cisticercose. *T. solium* mede de três a cinco metros de comprimento. A cabeça ou escólex é provida de quatro ventosas e apresenta rostro armado com dupla coroa de ganchos. Além do escólex, o helminto possui o colo ou pescoço considerado uma região com altas taxas de proliferação celular, e finalmente, o estróbilo ou corpo com as proglotes ou anéis. *T. saginata* mede de seis a sete metros e não possui ganchos no rostro armado (Carrada-Bravo, 1987; Gemmel et al., 1983; Huggins, 1989).

A teníase pode se apresentar de forma assintomática, porém alguns pacientes manifestam alterações no apetite (anorexia ou apetite exagerado),

náuseas, vômitos, dor abdominal, diarréia, emagrecimento, irritação e fadiga (Carrada-Bravo, 1987; Huggins, 1989).

A importância do complexo teníase-cisticercose para a saúde pública resulta de que o homem além de hospedeiro definitivo da tênia pode se tornar hospedeiro intermediário e abrigar a fase larval do parasito. Sendo este fenômeno denominado de cisticercose humana (Acha & Szifres, 1986; Rey, 1991).

A cisticercose é conhecida desde a antiguidade, entretanto, a natureza dessa helmintíase ficou desconhecida até a segunda metade do século XIX, quando pesquisadores alemães demonstraram que a forma larvária da *T. solium* era responsável pelo desenvolvimento da doença em animais e em humanos (Del Brutto & Sotelo, 1988).

Os cisticercos medem de sete a 12 mm de comprimento por quatro a seis mm de largura (Rey, 1992). Os parasitos adultos (tênias) são específicos do hospedeiro definitivo, enquanto que as fases larvárias (cisticercos) apresentam certa inespecificidade, sendo encontradas em várias espécies de mamíferos (Rey, 1973; Rey, 1991).

### 1.1.1 Ciclo biológico e modo de transmissão

O homem adquire a teníase ao ingerir carne contaminada crua ou mal cozida, contendo a forma larval (cisticercos) do helminto adulto, *T. solium* ou *T. saginata* (Gemmell et al., 1983).

A cisticercose ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados (frutas e verduras) com ovos de *T. solium*, por meio do uso de água para irrigação contaminada com água de esgoto, ou ainda pela utilização de fezes humanas como adubo. Outra fonte importante de infecção são os manipuladores de alimento, que contaminam os mesmos por maus hábitos higiênicos. O próprio portador de teníase, através de maus hábitos de higiene, também pode se auto-infectar. Acredita-se ainda, que haja possibilidade de uma auto-infecção interna devido aos movimentos retro-peristálticos ou vômitos em que os ovos do intestino delgado voltam para o estômago e sofrem ação do suco gástrico, liberando as oncosferas para a corrente circulatória que se fixam nos diversos tecidos (Acha & Szifres, 1986; Rey, 1991).

Os ciclos de *T. solium* e *T. saginata* implicam dois hospedeiros, um definitivo e um intermediário. O único hospedeiro definitivo de ambas as tênias (fase adulta do parasito) é o homem, em cujo intestino delgado se alojam. Os hospedeiros intermediários de *T. solium* são os suínos e os de *T. saginata* são os bovinos, desenvolvendo a fase larval nos tecidos (Acha & Szyfres, 1986; Rey, 1991). Há portanto, três fases com relação à população de parasitos: adultos no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e cisticercos (fase larval) no hospedeiro intermediário (Gemmell & Lawson, 1982; Gemmell et al., 1983). Quando os ovos de tênia são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os embriões (oncosferas) se libertam do ovo no intestino delgado pela ação do suco digestivo e bile.

As oncosferas penetram na parede intestinal e, em 24 a 72 horas, difundem-se no organismo através da circulação sanguínea. Ocorre então formação de cisticercos e o alojamento dos mesmos em diferentes tecidos de órgãos do hospedeiro, como músculo esquelético e cardíaco, sistema nervoso central, dentre outros, desenvolvendo a cisticercose (Gemmell et al., 1983) (Figura 1).

Os cisticercos presentes na carne crua ou mal cozida, uma vez ingeridos, são liberados durante a digestão da carne. O escólex desenvagina-se sob ação da bile, fixando-se no intestino delgado, o qual dará origem ao helminto adulto, desenvolvendo assim a teníase (Figura 1) (Gemmell et al 1983).

Sabendo-se que a prevalência mundial de teníase por *T. solium* foi estimada em 2,5 milhões e a de cisticercose em 300 mil pessoas (Nascimento et al.1991) a importância do complexo teníase-cisticercose para a saúde pública torna-se evidente (Chimelli et al. 1998).

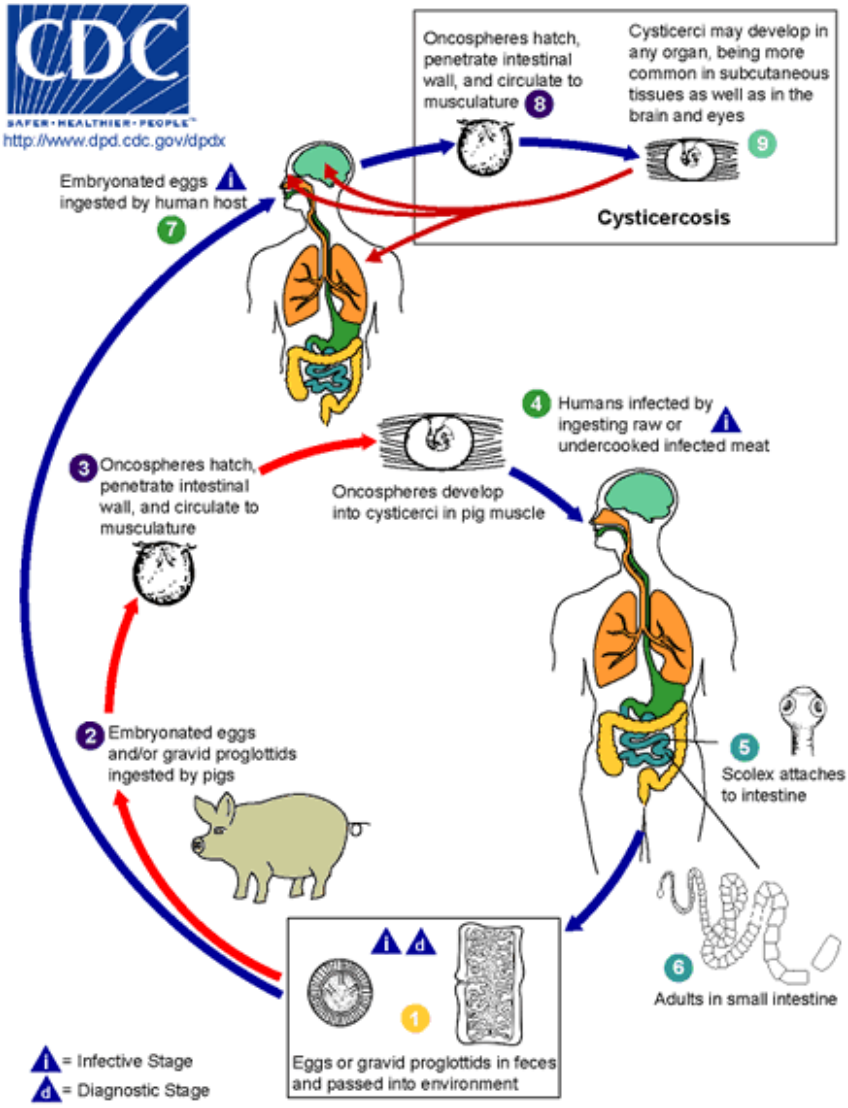


**Figura 1**: Ciclo de vida da *Taenia solium.*

### 1.2 *Taenia crassiceps*

*T. crassiceps* é um helminto da família *Taenidae*, ordem *Cyclophyllidea* e classe *Cestoda*. A forma larval ou cisticerco é chamada de *Cysticercus longicollis.* Este mede em torno de 4-5 mm de diâmetro e apresenta escólex invaginado capaz de produzir inúmeros brotamentos na superfície de sua membrana (Freeman 1962 ; Maillard et al.1998).

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

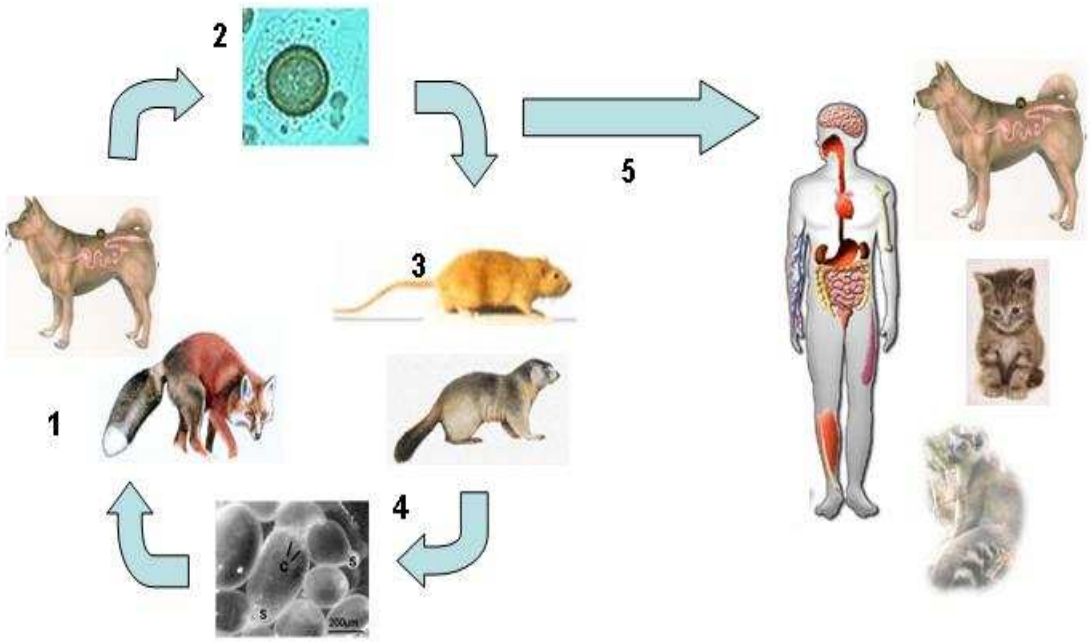


**Figura 2**. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*, com seus hospedeiros definitivos, canídeos, (1) – ovo presente nas fezes (2) - hospedeiros intermediários, roedores (3) –, cisticerco (fase larval) (4) e hospedeiros paratênicos – mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos (5) (adaptado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

### 1.2.1 Epidemiologia

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

Além dos animais selvagens descritos acima, existem evidências de que o homem também pode adquirir cisticercose por *T. crassiceps* de forma acidental, atuando assim como hospedeiro paratênico deste parasito. A cisticercose humana por *T crassiceps* ocorre por meio da ingestão de ovos deste cestóide presente em água ou alimentos contaminados. (Freeman 1962; Deblock &Petavy 1983; Dyer & Greeve 1998; Brojer et al. 2002).

A cisticercose humana por *T. crassiceps* ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos como indivíduos portadores de HIV (François et al. 1998) ou com neoplasias como o linfoma (Heldwein et al. 2006). No entanto, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver cisticercose por *T. crassiceps* (Arocker et al. 1992).

Existem outros casos descritos na literatura de cisticercose no sistema nervoso central e no subcutâneo em animais domésticos como cães e gatos ressaltando a importância destes na transmissão e incidência da cisticercose humana por *T. crassiceps* (Wunschmann et al. 2003).

## 2. Modelo de cisticercose experimental

A infecção de hospedeiros intermediários com cisticercos de *T. crassiceps* é um modelo experimental muito bom para se estudar os mecanismos da relação parasito-hospedeiro na cisticercose e neurocisticercose (Terrazas et al 2008). A fase larvária de *T. crassiceps* pertencente à cepa ORF, é utilizada atualmente como modelo experimental

para estudo da cisticercose humana, por meio da inoculação dos cisticercos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c isogênicos sendo mantidos indefinidamente por inoculações subsequentes a cada 60 dias de infecção (Freeman et al. 1962, Esch e Smyth 1976).

Os cisticercos provenientes da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c, podem ser divididos em três fases de acordo com seus aspectos macroscópicos. A fase inicial é caracterizada por um cisticerco translúcido e pequeno, que mede aproximadamente 2 μm de diâmetro (Figura 3A). O cisticerco na fase inicial aumenta seu tamanho, mantendo-se translúcido, porém com alguns brotamentos em sua superfície, sendo denominado de cisticerco em fase larval (Figura 3B). No decorrer de seu desenvolvimento, ele torna-se mais opaco com numerosos brotamentos, sendo chamado de cisticerco em fase final (Figura 3C) (Vinaud 2007).

Sabendo-se que estas larvas não possuem escólex, portanto não têm a capacidade de desenvolver o helminto adulto, estes estudos da cisticercose intraperitoneal experimental vêm sendo realizados com relativa facilidade, pois, além de se multiplicarem rapidamente no peritônio do animal, estes cisticercos apresentam grande similaridade antigênica com cisticercos de *T. solium,* facilitando o estudo e a compreensão dos processos inflamatórios locais e sistêmicos, a fim de se avaliar a resposta geral do hospedeiro frente a este patógeno (Vaz et al. 1997).

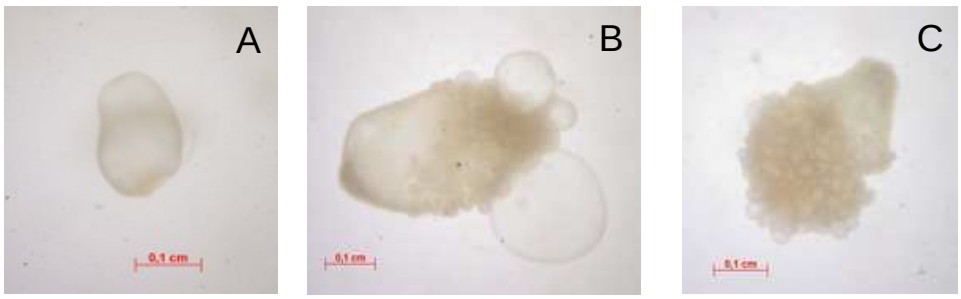


**Figura 3:** Aspectos macroscópicos de cisticercos de *T. cracisseps* provenientes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas após 60 dias de infecção. (A) cisticerco em fase inicial; (B) cisticerco em fase larval e (C) cisticerco em fase final.

## 3. Introdução à Imunologia

A resposta imune humana é tradicionalmente dividida em dois tipos: imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida (Figura 4). A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo e fazem parte desta as barreiras anatômicas e fisiológicas, as células e os componentes humorais. As barreiras anatômicas e fisiológicas são constituídas pela pele intacta, o pH ácido do estômago, lisozimas bacteriolíticas nas lágrimas e salivas, mecanismos mucociliares de limpeza das vias aéreas superiores e que são cruciais na defesa contra patógenos. As células envolvidas na imunidade inata incluem células de origem hematopoética e não hematopoética, como: macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos células *natural killer* (NK) e células da pele como macrófagos e mastócitos, células do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário (Turvey et al. 2009).

Os macrófagos foram inicialmente descritos como células fagocíticas responsáveis pela eliminação de patógenos. Foi descoberto que a citocina interferon gamma (IFNγ) convertia macrófagos quiescentes em células com alta capacidade de apresentação de antígenos, além de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores tóxicos como as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (ROS) como, por exemplo, o óxido nítrico (NO, do inglês nitric oxide). Dessa forma, estes macrófagos se tornam aptos a eliminar bactérias e principalmente patógenos intracelulares. Tais células receberam o nome de macrófagos classicamente ativados, pois exercem as funções descritas acima e são ativados pelo IFNγ (Martinez et al 2009).

A Interleucina - 4 (IL-4), em contrapartida atua em macrófagos inibindo a capacidade de produzir mediadores tóxicos (espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio) e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e IL-8. Além disso, a IL-4 aumenta a expressão de moléculas MHC classe II (Complexo de Histocompatibilidade Principal, do inglês, Major Histocompatibility Complex) nestes macrófagos. Macrófagos ativados por IL-4 foram chamados de macrófagos alternativamente ativados os quais expressam receptor fagocítico e exercem atividades diferentes quando comparados com os macrófagos classicamente ativados (Martinez et al 2009).

Os componentes humorais da imunidade natural são proteínas do complemento, proteína C reativa, pentraxinas, colectinas e os peptídeos antimicrobianos (AMPs do inglês antimicrobial peptides), que são responsáveis por destruir agentes patogênicos no momento em que estes entram em contato com o organismo (Holzl et al. 2008). Alguns exemplos de AMPs são as defensinas produzidas principalmente por leucócitos e que possuem a habilidade de destruir a membrana celular de bactérias Gram negativas ou Gram positivas, assim como as catelicidinas que compoem a maioria dos grânulos presentes em neutrófilos e tem mostrado ação antimicrobiana efetiva (Holzl et al. 2008).

Apesar dos mecanismos de defesa descritos acima, a imunidade inata possui baixa especificidade reconhecendo os patógenos por um número limitado de receptores, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês Pattern recognition receptor) (Holzl et al. 2008). No entanto este número limitado de receptores, é compensado pelo reconhecimento de componentes microbianos chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês pathogen associated molecular patterns), que são compartilhados pela maioria dos grupos de agentes patogênicos (Turvey et al. 2009).

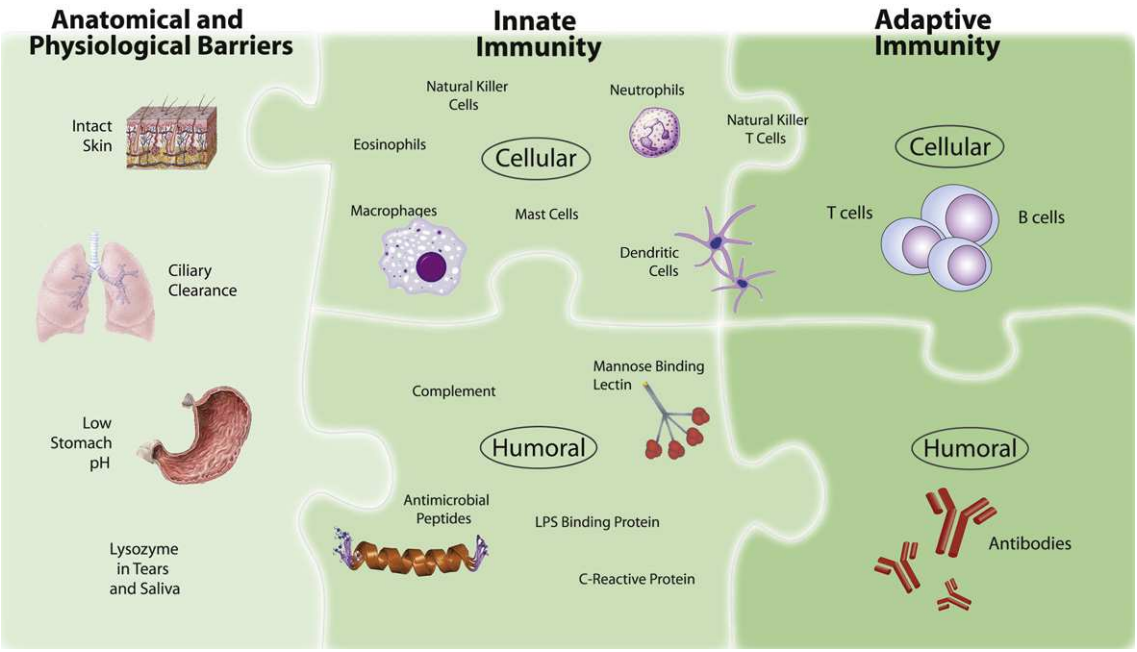


**Figura 4**. Sistema imune humano: O sistema de defesa humano aos patógenos pode ser dividido em dois tipos: (1) Imunidade inata (2) imunidade adaptativa (Turvey et al. 2009)

A velocidade é uma característica da imunidade inata, pois após poucos minutos de exposição ao patógeno, esta começa a gerar uma resposta protetora. Além disso, a imunidade inata desempenha um papel central na ativação posterior da resposta imune adaptativa (Turvey et al. 2009).

A imunidade adaptativa é desenvolvida apenas após a exposição ao antígeno e envolve componentes celulares e humorais, sendo que os linfócitos T e B são as principais células de defesa que medeiam esta imunidade. Em contraste com o número reduzido de repertório dos receptores utilizados pelas células da imunidade inata, a imunidade adaptativa possui uma grande diversidade de receptores sendo estes bastante específicos. O benefício desta diversidade de receptores é que a imunidade adaptativa é capaz de reconhecer praticamente qualquer antígeno (Turvey et al. 2009). Após o encontro com o patógeno, linfócitos T e B sofrerão expansão clonal e diferenciação, montando uma resposta imune capaz de eliminar o patógeno invasor (Turvey et al. 2009).

Vários perfis imunes de células T já foram caracterizados, dentre eles, os mais conhecidos são os perfis Th1 e Th2 (Th, do inglês T helper), os quais

foram descobertos por meio de estudos em modelos murinos, caracterizados com base nas citocinas sintetizadas (Mosmann et al, 1986; Mosmann & Sad, 1996). No entanto, existem outros, definidos recentemente como o perfil Th17 e T regulador (Treg) ( Boyton et al.2002) (Figura 5).

A diferenciação dos linfócitos Th em Th1 e Th2 ocorre a partir de uma célula T naive precursora ou T auxiliar periférica (Thp), em resposta aos estímulos fornecidos pela célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês Presenting Cell Antigen) no momento da apresentação do mesmo (Ansem et al. 2009).

A diferenciação dos linfócitos Th é definida predominantemente pelas citocinas do microambiente e pela interação do receptor de célula T com o antígeno (Boyton et al.2002). O perfil Th1 é caracterizado pela produção de IFNγ e está envolvido na imunidade celular a patógenos intracelulares. A IL-12, produzida pelas células da imunidade inata, bem como o IFNγ produzido pelas células NK e células T, induzem a diferenciação do perfil Th1 (Boyton et al.2002).

A diferenciação do perfil Th1 ocorre por meio da transcrição do fator STAT-4 (do inglês, signal transducer and activator of transcription 4), o qual promove a expressão de múltiplos genes, incluindo o gene de IFNγ. O STAT-4 induz a transcrição do fator T-bet, que promove a expressão da cadeia β do receptor da IL-12, que por sua vez aumenta a responsividade a esta citocina, e finalmente, antagoniza os mecanismos que induzem a diferenciação do perfil Th2 (Figura 6) (Ansem et al. 2009).

As células do perfil Th2 produzem IL-4, IL-13 e IL-5 e participam na imunidade humoral, ou seja, produção de anticorpos em infecções helmínticas e outros patógenos extracelulares. Este perfil, por sua vez, é induzido pela citocina IL-4, pois esta promove a transcrição do fator STAT-6 (do inglês, signal transducer and activator of transcription 6), que é responsável pela expressão do fator GATA-3 que pode diretamente ativar os genes da IL-4, IL-5 e IL-13, além de inibir os mecanismos de diferenciação do perfil Th1 (Figura 6) (Ansem et al. 2009).

O perfil imune Th17 é induzido pelo fator transformador do crescimento (TGFβ do inglês transforming growth factor-beta), juntamente com IL-6, IL-21 e

IL-23. Este perfil requer a ativação de um fator de transcrição chamado RORγt (ROR, do inglês retinoid-related orphan receptor) e a fosforilação do fator STAT-3. O perfil Th17 é caracterizado pela produção de IL-17 e IL-22 e participam na defesa contra bactérias e fungos extracelulares, principalmente na superfície de mucosas (Chen et al. 2007).

Diante de tantos perfis de células T efetoras, é necessário que a resposta imune seja regulada ou modulada para que haja o efetivo controle das infecções e para a prevenção de doenças auto-imunes. Para isto, as células T reguladoras (Treg) exercem uma função essencial na manutenção da homeostase imune, regulando as respostas T efetoras e assim prevenindo seus potenciais efeitos patogênicos (Vignali et al.2008 ; Shevach 2009).

O perfil Treg é caracterizado pela expressão do fator Foxp3 (Fox, do inglês forkhead box), o qual tem uma importante função na manutenção deste perfil (Hori et al. 2003; Fontenot et al.2003; Khattri et al.2003; Fontenot et al.2005). As células T reg exercem função supressora sobre as respostas Th1 e Th2, porém, não é claro se esta supressão também acontece sobre as células Th17 (Kanangat et al.1996; Kim et al. 2007).

Na imunidade adaptativa, os linfócitos T promovem a morte do agente infeccioso ou da célula infectada, induzindo a apoptose, ou ativam células vizinhas por meio de citocinas, sendo responsáveis pela imunidade celular. Os linfócitos B, por sua vez, produzem os anticorpos que neutralizam o agente infeccioso para sua posterior destruição, sendo responsáveis pela imunidade humoral (Maglione et al. 2009).

A imunidade humoral é mediada por anticorpos secretados e a sua função fisiológica é a defesa contra microrganismos extracelulares e toxinas bacterianas. Os anticorpos são produzidos por linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos e estão presentes nas secreções mucosas, nas quais agem proporcionando defesa contra microrganismos ingeridos e inalados, e frequentemente no sangue, de onde são capazes de circular para qualquer local onde o antígeno esteja localizado (Abbas et al. 2005).

Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura básica composta de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, tanto as cadeias pesadas quanto as cadeias leves possuem uma região variável (V) que participa no reconhecimento dos antígenos e região constante (C), sendo que

as regiões C das cadeias pesadas desempenham as funções efetoras (Abbas et al. 2005).

Os receptores para moléculas de imunoglobulina estão presentes nos macrófagos, neutrófilos, células NK (do inglês natural killer), eosinófilos e mastócitos. Estes receptores interagem com as regiões Fc (fração cristalizável localizada na região constante) das diferentes classes de imunoglobulinas e promovem atividades como fagocitose, destruição de uma célula tumoral e degranulação de mastócitos (Roitt et al. 2003)

A resposta imune adapatativa auxilia a resposta inata na eliminação dos patógenos e modula o perfil de macrófagos. Como referido acima, no perfil Th1, a citocina IFNγ promove a diferenciação de macrófagos classicamente ativados e a resposta Th2 por meio da IL-4 induz a diferenciação de macrófagos alternativamente ativados.

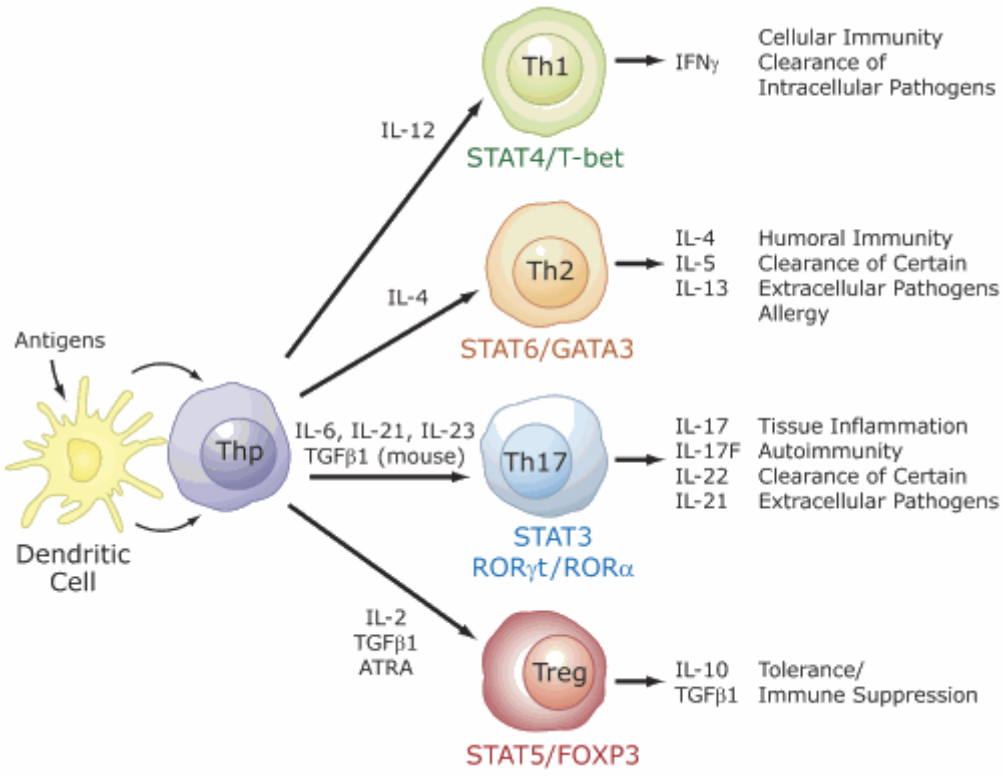


**Figura 5:** Diferenciação dos perfis de células T (Jetten et al.2009)

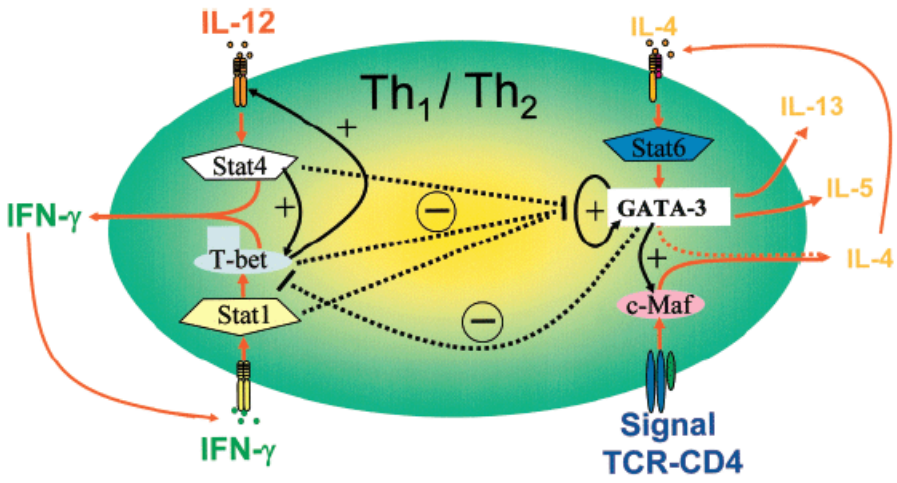


**Figura 6:** Fatores de transcrição e diferenciação dos perfis de células Th1 e Th2 (Biedermann et al. 2003)

### 3.1 Imunologia aos helmintos

Na imunidade inata os fagócitos atacam helmintos, secretando substâncias microbicidas para destruir organismos que são muito grandes para serem fagocitados. No entanto, muitos desses parasitos possuem o tegumento espesso, o que os torna resistentes a este mecanismo microbicida dos macrófagos e neutrófilos. A resposta imune adaptativa contra muitas infecções helmínticas é mediada pela ativação de linfócitos Th2, a qual resulta na produção de anticorpos IgE e na ativação de eosinófilos. Essas respostas são atribuídas à propensão dos helmintos de estimular a subpopulação de linfócitos Th2, as quais secretam IL-4 que estimula a produção de IgE e a IL-5 que estimula o desenvolvimento e a ativação de eosinófilos (Abbas et al. 2005).

Os anticorpos IgE se ligam à superfície dos helmintos e os eosinófilos então aderem por meio de receptores FcRε (receptores que se ligam a região C da IgE), sendo ativados para secretar grânulos com enzimas que destroem os parasitas (Abbas et al. 2005).

Os helmintos são chamados de imunorreguladores “mestres”, pois induzem respostas Th2 e estimulam células T reg e macrófagos alternativamente ativados (Hewitson et al. 2009). As respostas Th2 aos helmintos são mediadas por interleucinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-21, IL-

25 e IL-33, que levam a mecanismos efetores que incluem produção de IgE, ativação de mastócitos, eosinófilos, basófilos, contração da musculatura lisa e produção de muco intestinal. Os helmintos também induzem supressão sistêmica da imunidade inata e adquirida, talvez induzirem a expansão de células T reg (CD4+ CD25+) que produzem IL-10 e ou TGFβ, ou outro tipo de célula T, incluindo células T CD8+ com atividade supressora independente de citocinas (Jackson et al. 2008).

Estudo com helmintos intestinais mostraram que citocinas indutoras da resposta Th2 são importantes para o desenvolvimento da imunidade protetora, pois no ambiente intestinal as interleucinas, IL-3, IL-9, IL-4, e IL-13 atuam em mastócitos, células epiteliais não linfóides e células caliciformes induzindo expulsão do parasito por meio de reações fisiológicas, como produção de muco e hipercontratilidade muscular (Maizels et al. 2004)

As respostas imunes adquiridas aos parasitos  também podem contribuir para a lesão tecidual. Alguns parasitos e seus produtos induzem respostas granulomatosas com fibrose concomitante como por exemplo os granulomas formados ao redor dos ovos de *Schistosoma mansoni*. Na esquistossomose, a resposta imune Th2 exerce uma grande influência na sobrevivência do hospedeiro, pois as citocinas Th2 modulam a reação inflamatória excessiva prevenindo o dano tecidual. Isto foi observado em camundongos C57BL/6 deficientes em IL-4, que morreram após 8 semanas de infecção com *S. mansoni* devido a uma incontrolada produção de TNFα, o que leva a uma reação inflamatória intensa. Neste contexto, a resposta imune Th2, protege o hospedeiro não somente frente à infecção, mas também previne o prejuízo tecidual causado pela reação inflamatória intensa mediada por células Th1 (Maizels et al. 2004).

A proteção contra infecções helmínticas intestinais não é consistentemente restrita a IL-4, pois outra citocina Th2, a IL-13 pode se ligar a uma das cadeias do receptor da IL-4, tornando possível a sinalização por meio deste receptor, pois ambos possuem a cadeia alfa em comum que está presente em outras células que não são linfócitos T, como células epiteliais do pulmão e intestino, macrófagos e linfócitos B, mediando os mecanismos protetores a esta infecção (Finkelman et al. 1997). A IL-13 é menos importante que a IL-4 na regulação de respostas T e B e pode ser mais importante na

indução de contração do músculo liso e aumento da produção de muco pelas células caliciformes intestinais, levando a eliminação de vários tipos de helmintos gastrointestinais (Finkelman et al. 1999).

As células da imunidade inata como os neutrófilos e macrófagos também são muito importantes no início das fases efetoras de respostas Th2, pois uma vez ativadas, estas promovem a expansão e sustentam a população de células Th2 efetoras. Esta interrelação resulta na ação coordenada de células que agem contra o helminto invasor (Anthony et al. 2007). Os helmintos são conhecidos por induzirem aumento evidente de eosinófilos na corrente sanguínea, os quais migram rapidamente para o sítio da infecção, liberando seus grânulos proteicos (Rodriguez-Sosa et al. 2004). A importância dos eosinófilos foi avaliada por meio do bloqueio ou inibição da IL-5, citocina produzida por células Th2 necessária para a ativação e recrutamento de eosinófilos. Os estudos demonstraram que mesmo sem IL-5 e número diminuído de eosinófilos, houve resistência a uma variedade de helmintos. Os basófilos também são células que aumentam em número na corrente circulatória após uma infecção helmíntica, sendo os basófilos e os eosinófilos a maior fonte de IL-4 nas fases iniciais da resposta Th2, sugerindo que eles promovam o seu desenvolvimento e recrutamento para os sítios da inflamação (Min et al. 2004; Shinkai et al. 2002).

Os neutrófilos são ativados e recrutados durante a invasão tecidual por helmintos, e relatos têm indicado sua função importante, na defesa contra larvas de *Strongyloides stercoralis,* que na ausência de outros tipos celulares geralmente são conhecidos como componentes importantes na resposta Th2, que cooperam com outras populações de células, incluindo eosinófilos e macrófagos durante uma infecção helmíntica (Galioto et al. 2006).

Macrófagos são convencionalmente associados com respostas Th1 nas infecções virais e bacterianas, sendo neste caso, macrófagos classicamente ativados, pois atuam na destruição de microrganismos por meio de vias que são dependentes da síntese de NO (Mantovani et al. 2005). No entanto, vários estudos têm demonstrado a presença de macrófagos ativados de uma forma alternativa, ou seja, pelo estímulo de citocinas como IL-4 ou IL-13. Após a ativação estes macrófagos aumentam a expressão de arginase -1, receptor para manose (CD206), receptor α para IL-4 (IL-4Rα) e são rapidamente

recrutados para os sítios da infecção durante respostas Th2 a helmintos (Anthony et al. 2006; Hesse et al. 2001).

Os macrófagos alternativamente ativados parecem ter três funções principais, que são a regulação da resposta imune, a resistência à invasão parasitária e a cicatrização por meio do reparo da matriz e pela liberação de citocinas e fatores de crescimento angiogênicos que promovem a fibroplasia no local (Anthony et al. 2007). Em relação à regulação da resposta imune, estudos prévios indicam que macrófagos de granulomas ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni* podem suprimir linfócitos Th1. Além disso, macrófagos reguladores Gr1+F4/80+ têm sido identificados, quando a inflamação aguda exacerbada é amplamente controlada por macrófagos alternativamente ativados, demonstrando seu potencial regulador (Anthony et al. 2007).

Os granulomas são tradicionalmente associados a uma resposta inflamatória Th1 que se desenvolve em volta do microrganismo ou parasito invasor. Em infecções murinas experimentais com *S. mansoni,* a resposta imune inicial durante as primeiras quatro a seis semanas de infecção mostra uma resposta moderada Th1 gerada contra helmintos adultos, a qual é caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas proinflamatórias, tais como TNF$\alpha$, IL-1, IL-6 e IFN$\gamma$, porém, logo após a postura dos ovos a resposta imune sofre uma dominante polarização para Th2, caracterizada pelo aumento da expressão de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, ou seja, a resposta imune desenvolvida difere de acordo com a fase de desenvolvimento do parasito (Anthony et al. 2007).

Estudos com IL-4 e IL-13, em infecção experimental com *S. mansoni* demonstraram que a IL-4 direciona o desenvolvimento de resposta granulomatosa, sendo responsável por determinar o tamanho do granuloma, induzindo a proliferação de linfócitos Th2 produtores de citocinas IL-5 e IL-13. A IL-13 é a citocina responsável pela fibrose hepática ocasionada pelo parasito e também possui um efeito sinérgico com a IL-4 no estabelecimento de um granuloma rico em eosinófilos e com perfil Th2 dominante (Burke et al. 2009).

O papel das citocinas Th1 nos granulomas e fibrose formados ao redor dos ovos de *S. mansoni* ainda não está definido, porém experimentos com camundongos deficientes para o gene de IFN$\gamma$, a principal citocina Th1, ou

tratados com anticorpo anti - IFNγ na esquistossomose por *S. japonicum*, mostraram que o IFNγ é importante no desenvolvimento de granulomas e contribui para o recrutamento de neutrófilos (Burke et al. 2009). Com *S. mansoni* os resultados foram conflitantes, com reduzido aumento ou nenhuma mudança no tamanho do granuloma dos animais deficientes em IFNγ quando comparados com camundongos selvagens (Burke et al. 2009).

### 3.2 Imunologia da cisticercose experimental por *T. crassiceps.*

Alguns estudos da resposta imune de camundongos à infecção por cisticercos de *T. crassiceps* vêm sendo feitos, enfocando tanto a resposta nas primeiras semanas de infecção quanto em períodos mais avançados (Padilla et al. 2001).

A cisticercose experimental tem sido utilizada para explorar a função dos fatores biológicos envolvidos na suscetibilidade do hospedeiro, como fatores genéticos e a condição imune que afetam o crescimento parasitário. Além disso, a suscetibilidade à infecção por *T. crassiceps* em camundongos é associada ao gênero. Foi demonstrado que camundongos fêmeas são mais suscetíveis á infecção, pois alta concentração de estrógeno pode estar envolvida em um mecanismo imunoendócrino usado pelo parasito para manter um ambiente permissivo para o seu rápido crescimento (Larralde et al. 1995).

Camundongos BALB/c são particularmente suscetíveis à infecção larval com *T. crassiceps* com predominante resposta Th2. Ao contrário, camundongos C57BL/6 são conhecidos por serem geneticamente resistentes a infecção com larvas de *T. crassiceps* (Terrazas et al. 2008). Fragoso et al. (2008) observaram que camundongos BALB/c permitem o crescimento parasitário, enquanto camundongos C57BL/6 conseguem restringir a proliferação do parasito.

Na cisticercose experimental, as respostas imunes, que controlam o crescimento larval, são respostas mediadas por linfócitos T, enquanto anticorpos não têm sido decritos participando significativamente na imunidade protetora (Hermanek & Prokipic 1989). A resposta Th2 induzida em camundongos BALB/c, depende da sinalização via STAT-6 (por meio dos receptores IL-4 / IL-13), a qual tem um papel importante na promoção de

imunidade protetora contra muitos helmintos. No entanto isto não foi evidenciado em camundongos BALB/c deficientes em STAT6 (STAT-6-/-) que demonstraram um progressivo aumento no número de cisticercos na cavidade peritoneal. Interessantemente a medida que a infecção progredia, os camundongos que não eram deficientes para o gene de STAT6 (STAT-6+/+) apresentaram significante aumento na carga parasitária quando comparados com STAT6 -/- que controlaram satisfatoriamente a infecção, demonstrando que a sinalização via STAT6 foi envolvida na suscetibilidade da infecção por *T. crassiceps* em camundongos BALB/c (Terrazas et al. 2008).

A resposta Th1 na infecção experimental por *T. crassiceps* foi estudada para verificar se esta estaria envolvida com a resistência ou suscetibilidade a esta doença. Para tal foram utilizados camundongos deficientes para o gene de STAT4 (STAT 4 -/-), que quando infectados intraperitonealmente com cisticercos de *T. crassiceps* desenvolveram resposta Th1 fraca, com aumento da carga parasitária, ao passo que camundongos que não eram deficientes para o gene de STAT4 (STAT 4 +/+) foram capazes de controlar a infecção. Isto sugere que a resposta Th1 dependente de STAT 4 está envolvida na proteção da cisticercose experimental. Por outro lado, uma resposta Th2, mediada por STAT 6 facilita a sobrevivência do parasito (Rodriguez-Sosa et al 2002).

Outro estudo mostrou que à medida que a infecção intraperitoneal com cisticercos de *T. crassiceps* progride, a resposta imune é polarizada para Th2, refletindo a habilidade deste parasito e seus antígenos para induzir resposta Th2 (Terrazas et al. 1998). Isto provavelmente se deve a habilidade que estes parasitos têm de evadir e modular a resposta imune do hospedeiro, pois para sua sobrevivência, os parasitos empregam uma variedade de estratégias como, os produtos excretados e secretados (E/S), liberados pelos parasitos, induzem resposta imune antiparasitária, bem como modificam a função das células imunes. A paramiosina inibe a via clássica do complemento, já a taeniaestatina inibe tanto a via clássica como alternativa do complemento e, além disso, também inibe algumas proteases do hospedeiro, como a tripsina. As prostaglandinas E2 (PGE2) também tem sido isolada como produtos excretados e secretados de cisticercos de *Taenia sp*, e este mediador lipídico inibe a geração de citocinas Th1 (Leid et al. 1983; Katamura et al. 1995).

Os cisticercos de *T. crassiceps* liberam alguns produtos *in vitro* que possuem a habilidade de suprimir as respostas de linfócitos T, diminuindo a produção de IFNγ e IL-4, mas não de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Spolski et al. 2000). Os helmintos também expressam moléculas homólogas ao TGF-β e ao receptor da superfamília do TGF-β como observado em fases adultas de *Brugia malayi,* que secretam uma proteína homóloga do TGF-β do hospedeiro (Gómez – Escobar et al. 2000). O homólogo recombinante, pode unir-se ao receptor do TGF-β no hospedeiro que, juntamente com a IL-10 induz a geração de células reguladoras (McSorley et al. 2008).

De acordo com Toenjes et al (1999), altos níveis de IFNγ e IL-4 no soro durante a infecção crônica evidenciam a existência de uma resposta sistêmica mista Th1/Th2, sendo este um dos paradoxos da imunologia da cisticercose experimental, pois embora o IFNγ induza relativa resistência na fase inicial da infecção, durante a fase crônica, não possui efeito aparente sobre o número de parasitos.

Para provar a hipótese de que a resposta imune local é polarizada para Th2 e a resposta sistêmica é uma reposta mista Th1/Th2, os estudos de Toenjes et al (1999 e 2003) foram feitos para detectar a produção de citocinas nas fases iniciais da infecção intraperitoneal com cisticercos de *T. crassiceps*, em células do baço, linfonodos e células do exsudato peritoneal (CEP). No início da infecção houve aumento significante na produção de IL-4, IFNγ e IL-10. Esta última atua suprimindo a resposta Th1 pelas células esplênicas e do linfonodo, que incluem uma população de células que produz IFNγ em resposta a antígenos larvais. As respostas das células do exsudato peritoneal aos antígenos do parasito exibem uma resposta inicial mista Th1/Th2. Diferentes respostas imunes ocorrem em localizações anatômicas distintas, sugerindo que a resposta imune sistêmica é uma soma dos tipos de respostas imunes em diversos locais.

Durante a infecção, algumas mudanças podem ser detectadas localmente. Na cavidade peritoneal, por exemplo, inicialmente ocorre o recrutamento de linfócitos e monócitos. À medida que a infecção progride observa-se aumento de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (Terrazas et al. 2008). No entanto, os macrófagos recrutados após 3 semanas de infecção são

morfologicamente distintos, expressam diferentes marcadores de superfície, têm a produção de citocinas e a expressão gênica modificada, quando comparados com macrófagos recrutados durante a fase aguda da infecção (Terrazas et al. 2008). Os macrófagos recrutados no início da infecção são pró-inflamatórios de acordo com a produção de altos níveis IL-12 e NO, os quais estão relacionados com o controle do crescimento larval na cisticercose experimental. Na fase crônica os macrófagos produzem altos níveis de IL-6 e $PGE_2$ e a produção de IL-12 e NO é suprimida. Além disso, estes macrófagos foram capazes de ativar células T CD4+ a produzir IL-4, mas não IFNγ, sendo estes macrófagos associados a um estado alternativo de ativação (Terrazas et al. 2008). A presença de alta expressão de CD23, receptor para quimiocina 5 (CCR5) e receptor para manose (MR) /CD206 na superfície dos macrófagos e lectinas tipo C (mMGL1 e 2)/ CD301, além de arginase 1, membro da família da quitinase encontrada no sítio inflamatório (Fizz-1), Lectina com afinidade para quitina (Ym-1) e receptor expresso em células mielóides (TREM-2) confirmam que estes macrófagos são alternativamente ativados (Terrazas et al. 2008).

Padilla et al. (2001) avaliaram a evolução do processo inflamatório e os tipos celulares existentes, no decorrer da infecção com cisticerco de *T. crassiceps,* por meio da análise da suspensão celular do lavado peritoneal de camundongos infectados. Foi observado que em torno da oitava semana de infecção, o total de leucócitos atingiu um nível máximo, retornando ao normal na 25ª semana. Os eosinófilos foram os leucócitos mais freqüentes durante toda a infecção, aumentando rapidamente na segunda semana, mas com picos variados até a oitava semana. Estas células decresceram para a metade dos níveis máximos na 25ª semana de infecção. Os macrófagos aumentaram na segunda semana, retornando aos níveis normais na 15ª semana de infecção. Os linfócitos atingiram o pico na sexta semana de infecção, retornando ao normal na 15ª semana. Basófilos e neutrófilos foram escassos em todo o decorrer do processo inflamatório.

Na neurocisticercose a morte do cisticerco resulta no influxo de células inflamatórias e formação de granuloma, que é um processo inflamatório caracterizado por rápida e temporária cascata de citocinas e quimiocinas e outras moléculas sinalizadoras que limitam a infecção ou restringem o dano tecidual, mas também recrutam um importante número de células imunológicas

para o sítio infeccioso. No entanto, a ativação exacerbada ou a falência da imunomodulação dessas respostas contribuem para estados de doença aguda ou desordens inflamatórias crônicas (Terrazas et al. 2008).

A morte do cisticerco na neurocisticercose é provavelmente iniciada pela secreção de citocinas Th1, o que resulta no influxo de monócitos e macrófagos. Acredita-se que dentro do granuloma, o IFNγ estimula macrófagos a eliminar cisticercos por meio da ativação da enzima fagócito–oxidase e produção de ROS e metabólitos dos reativos do nitrogênio como o NO, os quais podem destruir o parasito. Macrófagos e linfócitos T foram encontrados intimamente localizados na camada fibrosa do granuloma, enquanto que eosinófilos foram incomuns em granulomas murinos e humanos (Terrazas et al. 2008). Em pacientes com neurocisticercose foi descrito que há uma resposta inicial Th1, que eventualmente se desenvolve para um padrão misto Th1/Th2 interligado com a formação do granuloma, fibrose e angiogênese (Restrepo et al. 2001).

A fim de caracterizar o perfil imune observado em granulomas formados em modelos de cisticercose intraperitoneal experimental, Robinson et al (1997) realizaram a detecção das citocinas. Estes autores observaram que a resposta imune Th1 era predominante no início dos granulomas. Por outro lado, a IL-4 (resposta Th2), juntamente com a resposta Th1, foi identificada em granulomas tardios após a destruição do parasito, evidenciando que as células produzem um perfil misto de citocinas Th1 e Th2. Esses dados sugerem uma resposta imune temporal a qual inicia-se como Th1, causando a destruição do parasito, sendo, portanto importante na resistência da infecção larval. Após a sua destruição, a IL-4 é expressa, sugerindo que a mesma pode atuar na modulação da resposta inflamatória (Robinson et al. 1997).

Recentemente, tem sido hipotetizado que neuropeptídeos podem regular a expressão de citocinas em granulomas na cisticercose (Robinson et al. 2002). A substância P é um polipeptídio produzido por células endoteliais, fibras nervosas e células do sistema imune, envolvido na transmissão da dor. Este neuropeptídeo é expresso mais comumente no início da formação dos granulomas, quando observa-se um padrão de citocinas Th1 predominante. A somatostatina, outro neuropeptídeo medeia a analgesia por meio da inibição da dor. Esta é expressa em granulomas mais tardios, associada com citocinas Th2. Além disso, a substância P estimula a produção de IFNγ e outras citocinas

pró - inflamatórias como IL-1β, e TNF α (Ryu et al. 2000; Rameshwar & Gascon 1995; Berczi et al. 1996).

Uma modulação temporal da resposta imune semelhante á observada no modelo de cisticercose intraperitoneal, foi notada em granulomas associados à esquistossomose, nos quais, no início ao redor dos ovos de *S. mansoni,* ocorre a produção tanto de IFNγ como de IL-4, seguida pela polarização predominante do perfil Th2 após a modulação da resposta imune inicial (Robinson et al. 1997).

A imunidade celular descrita frente à infecção humana por *T. solium* é uma resposta inflamatória abundante, na qual granulomas iniciais são predominantemente associados com uma resposta Th1 e com uma grande presença de neutrófilos, macrófagos, células natural killer (NK) linfócitos, Tγδ, T αβ e células B. Por outro lado, granulomas tardios refletem um padrão de resposta imune mista Th1/Th2 (Prasad et al. 2008). A resposta imune também é associada à sintomatologia, pois células provenientes de pacientes com neurocisticercose inflamatória mostraram uma predominância de resposta Th1, enquanto aqueles provenientes de pacientes com neurocisticercose não inflamatória desenvolveram uma resposta mista Th1/Th2. Por sua vez, a resposta imune humoral relacionada à neurocisticercose é associada à magnitude da infecção sendo maior em pacientes com múltiplos cistos, quando comparados com pacientes infectados com cisto único (Bueno et al. 2004). As respostas mediadas por anticorpos foram associadas à intensidade e a duração da infecção. Na neurocisticercose várias imunoglobulinas foram detectadas, destacando-se IgG, IgM, e pouca IgE sendo que a IgG é o isótipo mais frequentemente presente no soro, líquido cefalorraquidiano e saliva, o que sugere uma infecção a longo prazo (Corona et al. 1986; Luis et al. 1998).

Acredita-se que um dos desafios dos pesquisadores que estudam cisticercose, seja elucidar o perfil imune necessário para limitar o crescimento parasitário, mas ao mesmo tempo reduzir o dano tecidual e orgânico ao hospe deiro. Para isto, o presente estudo propõe um modelo experimental no subcutâneo, semelhante ao que ocorre em seres humanos e em animais. Este modelo, além de ser inédito, possibilita uma comparação com a cisticercose humana causada por *T.solium,* que também é predominante no subcutâneo.

Verificamos o papel da citocina IFNγ, principal citocina Th1, em camundongos de uma linhagem e gênero geneticamente resistentes (C57BL/6 -machos) e em camundongos deficientes em IFNγ (C57BL/6 - IFNγ -KO -machos) buscando desta forma, entender se esta citocina está relacionada com a resistência desta linhagem à cisticercose subcutânea experimental, e assim, juntamente com outras avaliações, entender o tipo de resposta imune formada neste modelo experimental.

# *OBJETIVOS*

**Objetivo geral**

Caracterizar a resposta imune (local e sistêmica) em camundongos C57BL/6 convencionais e deficientes do gene do IFNγ (IFNγ-KO), decorrente da infecção no subcutâneo por cisticercos de *Taenia cracisseps*.

**Objetivos Específicos**

Avaliar a quantidade de leucócitos pela leucometria total e contagem diferencial.

Avaliar o hemograma para verificação de possíveis alterações na série vermelha.

Avaliar processos patológicos gerais presentes no subcutâneo infectado.

Avaliar as alterações na presença das células mononucleares CD301+ do sistema imunológico, no subcutâneo de animais infectados, por meio de imunoistoquímica.

Avaliar a concentração sérica das citocinas Interferon γ, Interleucina-4, Interleucina-12 associadas ao processo inflamatório sistêmico.

# *MATERIAL E MÉTODOS*

**1. Animais.**

Foram utilizados camundongos machos isogênicos das linhagens C57BL/6 deficientes ou não do gene do IFNγ (IFNγ - KO) com 8 a 12 semanas de idade, pesando de 20 a 30 gramas, fornecidos e mantidos em gaiolas apropriadas de 20 cm x 30 cm no Biotério do IPTSP-UFG. Foi oferecida ração para camundongos autoclavada, e água acidificada e autoclavada *ad libitum*. A luminosidade foi controlada por fotoperíodo de 12 horas e a temperatura, intensidade de ruído e a umidade relativa do ar foram as do ambiente geral.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, protocolo número 021/08.

Foram utilizados quatro grupos de camundongos, distribuídos aleatoriamente, contendo 12 camundongos cada: Grupo 1 – camundongos C57BL/6 infectados com cisticercos de *T. crassiceps*; Grupo 2 – camundongos C57BL/6 IFNγ-KO infectados com cisticercos de *T. crassiceps;* Grupo 3 – camundongos C57BL/6 inoculados com solução salina tamponada com fosfatos (do inglês, Phosphate Buffered Saline) e; Grupo 4 – camundongos C57BL/6 IFNγ - KO inoculados com PBS.

**2. Manutenção do ciclo experimental e inóculo dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO com cisticerco de *Taenia crassiceps*.**

A cepa ORF é mantida no Biotério do IPTSP-UFG, por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de oito a 12 semanas de idade, desde 2002, de acordo com Vaz et al. (1997).

Os camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO foram inoculados com 10 cisticercos em fase inicial no subcutâneo da região dorsal. Foram utilizados 10 parasitos em suspensão, com volume mínimo de 0,2 mL de PBS. Nos animais controles foi inoculado apenas PBS (0,2 mL).

Nos dias experimentais 7, 30, 60 e 90, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 0,1g/mL da solução de Xilazina a 2% e Cetamina a 10%. Após a anestesia foi realizada punção intracardíaca para obtenção de sangue total e soro para análise hematológica e dosagem de citocinas. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical,

para a coleta do subcutâneo e subsequente análise anatomopatológica. Foram utilizadas duas repetições sendo três animais infectados e três animais controle em cada dia experimental.

**3. Análise Hematológica.**

Nos dias experimentais pré estabelecidos foi coletado o sangue dos animais, sendo utilizado como anticoagulante heparina sódica 25.000 U.I./mL. Desta forma, obtivemos sangue total, para a análise hematológica (contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de plaquetas), realizada parcialmente por procedimentos automatizados, de acordo com as técnicas de rotina do laboratório de patologia clínica do Hospital Araújo Jorge (HAJ/ACCG). Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos para a contagem diferencial dos leucócitos.

**4. Análise anatomopatológica.**

A análise anatomopatológica compreendeu o estudo macroscópico e microscópico dos processos patológicos presentes no subcutâneo decorrentes da infecção pelo cisticerco de *T.crassiceps*. Para tais análises, foi coletado após a eutanásia dos camundongos, por meio de deslocamento cervical, o subcutâneo adjacente ao local da implantação dos cisticercos. Seguiu-se a documentação fotográfica do mesmo por uma máquina fotográfica digital acoplada a uma lupa. Uma vez coletado, o subcutâneo foi fixado em formalina tamponada a 10% e processado para inclusão em parafina. As lâminas foram coradas pela técnica hematoxilina e eosina (HE) e picro-sírius para análise do colágeno. A análise patológica foi realizada observando-se a presença ou ausência do parasito, fases de desenvolvimento, presença ou ausência e preservação de suas membranas e infiltrado inflamatório presente no parasito, discriminando qual tipo celular predominante, e sua intensidade. Na interface parasito-hospedeiro, os processos patológicos analisados foram: 1) alterações da célula; 2) alterações do interstício; 3) alterações locais da circulação sangüínea; 4) pigmentações patológicas; 5) calcificação patológica; 6) edema e 7) inflamação.

Para a caracterização dos granulomas foi considerada a presença de leucócitos exsudados, em especial, os macrófagos, formando agregados celulares ao redor do parasito. Os granulomas foram classificados em granuloma primário ou exsudativo, secundário ou necrótico - exsudativo e terciário ou produtivo. Granuloma primário foi caracterizado por aglomerado de macrófagos ao redor do parasito, o granuloma secundário foi caracterizado por uma zona de necrose de extensão variável, zona de exsudação celular, presença de células epitelióides e o granuloma terciário foi caracterizado por apresentar uma menor área de necrose e exsudação celular diminuída com proliferação conjuntiva predominante (Brasileiro Filho, 2006).

As alterações patológicas foram classificadas de forma semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta com comprometimento de até 25% da área, moderada de 26 a 50% e acentuada maior de 50%. A análise microscópica para caracterização da resposta inflamatória local foi feita em diferentes períodos após a infecção como descrito anteriormente (Lino-Júnior et al. 2002).

A análise da fibrose foi realizada em lâmina corada pelo picro-sírius examinada sob luz polarizada, com objetiva de 40x, de acordo com os critérios pré - descritos para análise dos processos patológicos (Lino-Júnior et al. 2002).

**5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de IFNγ, IL-4 e IL-12p40.**

A detecção das citocinas IFNγ, IL-12p40 e IL-4 no soro foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). A técnica consistiu na utilização de anticorpos monoclonais para captura de IL-12 (o clone C17.8 a 5 µg/mL de PBS,); IFNγ (o clone XMG 1.2 a 5 µg/mL em PBS); IL-4 (11B11 a 10 µg/mL em PBS). Estes foram dispostos, no volume de 80 µL, nos poços das placas para ELISA (CORNING, NY, EUA), que foram mantidas a 4 ºC, por 24 h. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20 a 0,04 % e incubadas com solução de bloqueio (soro bovino fetal (SBF) a 3% em PBS), 200 µL/poço, por 1 h, a 37 ºC. As placas foram lavadas novamente em PBS-tween 20 e foram adicionados 80 µL dos soros puros equivalente a cada animal. Para as curvas padrões, foram adicionadas as citocinas murinas

recombinantes IFNγ, IL-4 e IL-12p40, (R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, EUA), em diluições sucessivas a 1:2 em meio RPMI completo, na concentração inicial de 10 ng/mL. As placas foram mantidas a 4 ºC por 24 h, sendo em seguida, lavadas novamente com PBS-tween 20. Os anticorpos monoclonais acoplados a biotina para IL-12 (o clone C15.6 a 5 µg/mL de solução de bloqueio), IFNγ (o clone ASN-18 a 5 µg/mL de solução de bloqueio); IL-4 (o clone BVD6 a 5µg/mL em solução em bloqueio) foram adicionados às placas (80 µL). Após 2 h a temperatura ambiente (T.A), as placas foram lavadas com PBS-tween 20 e foram adicionados 80 µL de streptoavidina-peroxidase (SIGMA) diluída 1:2.000 em solução de bloqueio. Após 1 h de incubação (T.A), as placas foram lavadas 10 vezes com PBS-Tween 20 e então foram adicionados 80 µL da solução de substrato, composta de O-fenilenodiamina diclorada (OPD, SIGMA) a 5 mg/mL em tampão citrato-fosfato pH 5,0, acrescida de 5 µL/mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes. As placas foram mantidas ao abrigo da luz durante 10 a 30 min (T.A.) e a reação colorimétrica foi interrompida com 50 µL de solução de ácido sulfúrico a 2 N. A densidade óptica (D.O.) foi detectada por leitor de microplacas Thermo Labsystems, com filtro de 492 nm e filtro de referência de 620 nm (Oliveira et al. 2000; Oliveira et al. 2005).

**6. Análise dos tipos celulares por imunoistoquímica**

Foi feita a fenotipagem de macrófagos no sítio do inóculo (região subcutânea) pela técnica de imunoistoquímica, para esta determinação foram utilizados anticorpos monoclonais ER-MP23, cujos hibridomas foram cedidos pelo Dr. Pieter J M Leenen (Centro Médico Universitário de Erasmo de Roterdã, Holanda) para a marcação de células que apresentam em sua superfície o receptor CD301.

Para a realização da técnica de imunoistoquímica e identificação dos tipos celulares, as lâminas obtidas por meio de cortes histológicos, foram colocadas na estufa por 15 minutos, para retirar a parafina e, em seguida foram submetidas a 3 banhos em xilol por 10 minutos cada, com o mesmo intuito de retirar a parafina. Após estes banhos em xilol, os cortes foram hidratados gradativamente em álcool absoluto, 95%, 80% e 70% por 2 minutos, respectivamente e sucessivamente, deixando secar completamente.

Após este processo, as lâminas foram submetidas ao processo de recuperação antigênica térmica em panela a vapor (Steam Cuisine), onde foram imersas em tampão TRIS-EDTA pH 8.9 durante 30 minutos, à $95^{O}$ C.

Após a recuperação antigênica, foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena, com 50 µL de solução de água oxigenada a 3% durante 10 minutos. Após a incubação os cortes são lavados 3 vezes com PBS e as lâminas são secadas com papel absorvente. Em seguida foi feito o bloqueio protéico com solução de leite molico a 1% (0,5 g de leite em pó molico em 50 mL de PBS 1x) pipetando-se 50 µL em cada corte e incubando durante 30 minutos.

Após a incubação com o bloqueio, foram adicionados 50µL do anticorpo ERMP23 na concentração de 1µg/mL, diluído em solução bloqueio molico a 1% deixado a temperatura ambiente em câmara úmida durante cerca de 18 horas (overnight).

Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween 20 e secadas ao redor do corte com papel absorvente. Após a secagem, foram adicionados 50 µL de estreptoavidina-peroxidase diluída (1:300) em solução bloqueio leite molico a 1% e as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação as lâminas foram lavadas 5 vezes com PBS Tween 20 e secadas ao redor dos cortes com papel absorvente; foram adicionados 50 µL de DAB líquido (DAKO). A reação foi encerrada com água destilada que escorreu por toda a lâmina, por 5 segundos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina por 10 segundos e em seguida as lâminas foram mergulhadas dentro de um béquer com água destilada para retirar o excesso de corante. Para análise microscópica foi adicionado sobre a lâmina uma gota de entelan e a lamínula para observar os tecidos ao microscópio de luz.

As células CD301+ foram classificadas de forma semi-quantitativa, seguindo os seguintes critérios: ausente, discreta com comprometimento de até 25% da área, moderada de 26 a 50% e acentuada maior de 50%. A análise microscópica para caracterização da resposta inflamatória local foi feita em diferentes períodos após a infecção como descrito anteriormente (Lino-Júnior et al. 2002).

## 7. Análise Estatística

Foi realizada por meio do programa Sigma Stat. Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Foi utilizado o teste t de student e ANOVA. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

# *RESULTADOS*

**1. Análise hematológica**

Para avaliar a influência da infecção no subcutâneo de camundongos machos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO com cisticercos de *T. crassiceps* na hematopoiese foi realizada a análise hematológica. Em camundongos de ambas as linhagens observou-se que não houve alteração na série vermelha (contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM), plaquetária ou leucocitária quando comparados animais infectados e controles, ao longo dos dias experimentais e entre as duas linhagens (apêndice).

**2. Análise anatomopatológica**

Para avaliar os processos patológicos, e a resposta inflamatória presentes no subcutâneo de camundongos infectados com cisticercos de *T. crassiceps,* foi realizada a coleta do tecido adjacente ao local da infecção (Figuras 7 e 8).

A análise dos processos patológicos presentes no parasito e na interface parasito-hospedeiro ao longo do tempo e nas duas linhagens, estão descritos na tabela 1.

Aos sete dias após a infecção, nos camundongos da linhagem C57BL/6, foi observada a presença dos cisticercos no subcutâneo, em diferentes fases de desenvolvimento (inicial, larval, e final), porém, com predomínio da fase inicial. Observou-se ainda uma vesícula pequena contendo em seu interior um pequeno número de cisticercos aderidos ao subcutâneo (Figura 7A). Microscopicamente as membranas destes cisticercos apresentavam-se preservadas nos parasitos na fase inicial, mas em destruição nas fases larvais e finais (Figura 9A). Na linhagem IFNγ-KO, aos sete dias de infecção observaram-se cisticercos em fase inicial e larval no interior de uma vesícula pequena, porém maior do que a encontrada na linhagem C57BL/6 (Figura 7 B). Ainda no parasito, observou-se infiltrado inflamatório de macrófagos apenas na linhagem C57BL/6 e de neutrófilos em ambas as linhagens. Na interface parasito-hospedeiro, os processos patológicos gerais e o infiltrado inflamatório foram semelhantes entre as linhagens, porém, observou-se a presença de linfócitos e eosinófilos somente na linhagem IFNγ - KO. Neste dia experimental não se observou a formação de granuloma na linhagem C57BL/6, enquanto

que na linhagem IFNγ - KO observou-se granuloma secundário (Tabela 1, Figura 9B, 9C, 9D, 9E, 9F). Na análise do colágeno na linhagem C57BL/6, observou-se a presença discreta de fibras curtas e pouco organizadas, caracterizando colágeno tipo 3, distribuídas em meio ao infiltrado inflamatório circundando o cisticerco. A presença moderada deste tipo de colágeno também foi observada neste mesmo dia experimental na linhagem IFNγ - KO, porém com intensidade maior (Figura 13 A e 13B).

Aos 30 dias de infecção, na linhagem C57BL/6, foram encontrados cisticercos em fase inicial, larval e final, com predomínio de cisticercos em fase inicial e larval. Estes estavam no interior de uma vesícula maior do que no dia experimental anterior, pois albergava maior número de cisticercos (Figura 7 C) Microscopicamente foi observado cisticerco na fase inicial sem infiltrado inflamatório. Na linhagem IFNγ - KO observou-se uma vesícula maior quando comparada com a outra linhagem (Figura 7D). Microscopicamente, encontrou-se o parasito em fase inicial, larval e final de desenvolvimento. No parasito, observou-se na linhagem IFNγ - KO um infiltrado inflamatório com neutrófilos, além de necrose caseosa no parasito, o que não foi encontrado na linhagem C57BL/6 (Tabela 1, Fig 10 A e 10 B). Na interface parasito-hospedeiro os processos patológicos e o infiltrado inflamatório foram semelhantes, entretanto, na linhagem IFNγ - KO observou-se também a presença de calcificação distrófica e na linhagem C57BL/6 a presença de edema. Estes processos patológicos encontrados caracterizam um granuloma terciário na linhagem IFNγ - KO e um granuloma secundário na linhagem C57BL/6 (Tabela 1, Figura 10C, 10D, 10E, 10F). Na linhagem C57BL/6, assim como na linhagem IFNγ - KO, foi observada a presença moderada de fibras colágenas curtas, pouco organizadas, bem como fibras colágenas maiores e organizadas, o que caracteriza a presença de um colágeno misto do tipo 1 e 3, distribuídos em meio ao infiltrado inflamatório circundando o cisticerco (Figura 13 C e 13 D).

Na linhagem C57BL/6, aos 60 dias após a infecção, foi observado cisticerco em fase inicial, larval e final no interior da vesícula que ocupa quase todo o subcutâneo dorsal do animal, com grande quantidade de parasitos em seu interior (Figura 8A). Microscopicamente, observou-se parasitos na fase inicial com infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos (Fig 11A). Na

linhagem IFNγ - KO observou-se uma vesícula menor, quando comparada com a linhagem C57BL/6, contendo em seu interior cisticercos em fase inicial, larval e final (Figura 7D e 11B). Na interface parasito–hospedeiro os processos patológicos e o infiltrado inflamatório foram semelhantes entre as linhagens, porém na linhagem C57BL/6, também foi observada a presença de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos além de pigmentação e edema. Observou-se também que, na linhagem C57BL/6, a área mais próxima ao parasito estava delimitada por uma grande quantidade de neutrófilos, a qual estava separada de um infiltrado inflamatório acentuado de macrófagos por uma camada de fibrose, localizados em uma área mais distante do parasito, o que não foi observado na linhagem IFNγ - KO. Estes processos patológicos caracterizam um granuloma terciário em ambas as linhagens (Tabela 1, Fig 11C, 11D, 11E, 11F). Na linhagem C57BL/6 e IFNγ - KO observou-se fibras alongadas e organizadas de intensidade moderada, o que caracteriza o colágeno tipo 1 distribuído em meio ao infiltrado inflamatório circundando o cisticerco (Figura 14 A e 14 B).

Aos 90 dias de infecção, na linhagem C57BL/6, observou-se parasitos em todas as fases de desenvolvimento, com predomínio de cisticercos larvais e finais, porém, a vesícula que albergava os mesmos diminuiu de tamanho e apresentava um aspecto opacificado e fibrótico (Figura 8C e 12A). Na linhagem IFNγ - KO, observou-se uma vesícula semelhante àquela encontrada aos 60 dias desta mesma linhagem, contendo em seu interior cisticercos em diferentes fases, porém maior e translúcida quando comparada com a vesícula encontrada na linhagem C57BL/6 neste mesmo dia experimental (Figura 8D e 12B). Na interface parasito-hospedeiro, os processos patológicos e o infiltrado inflamatório foram semelhantes entre as linhagens. Entretanto, na linhagem C57BL/6 também foi encontrada a presença de plasmócitos e eosinófilos além de pigmentos de hemossiderina. Estes processos patológicos caracterizam um granuloma terciário em ambas as linhagens (Figura 12C, 12D, 12E, 12F). Na linhagem C57BL/6, foi observada a presença moderada de fibras colágenas alongadas e organizadas, caracterizando o colágeno tipo1, o que também foi observado na linhagem IFNγ - KO, porém de intensidade acentuada (Figura 14 C e 14 D).

**Tabela 1:** Análise dos processos patológicos gerais presentes no subcutâneo de camundongos da linhagem C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO infectados com cisticercos de *Taenia crassiceps*.

| **Local** | **Parasito** | | | | | | | | **Interface parasito-hospedeiro** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **7 dias** | | **30 dias** | | **60 dias** | | **90 dias** | | **7 dias** | | **30 dias** | | **60 dias** | | **90 dias** | |
| **Linhagem** | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 | KO | C57 |
| **Pocessos patológicos** | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Linfócitos | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | ++ | + |
| Plasmócitos | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | + | + | - | + | - | ++ |
| Macrófagos | - | + | - | - | - | - | - | - | +++ | + | ++ | ++ | + | +++ | +++ | ++ |
| Neutrófilos | +++ | +++ | ++ | - | - | + | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | + | ++ |
| Eosinófilos | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | - | ++ | + | - | + | - | + |
| Calcificação | - | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pigmentação | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Necrose caseosa | - | +++ | ++ | - | - | - | - | - | +++ | +++ | ++ | + | - | - | - | - |
| Edema | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | - | + | - | + | - | - |
| Hiperemia | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | + | + | + | + | - | - | - |
| Colágeno | | | | | | | | | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| Céls CD 301+ | | | | | | | | | - | + | - | +++ | ++ | - | +++ | - |
| Granuloma | - | - | - | - | - | - | - | - | 2ário | - | 3ário | 2ário | 3ário | 3ário | 3ário | 3ário |

Legenda:(-)Ausente,(+)Discreto,(++)Moderado,(+++)Acentuado

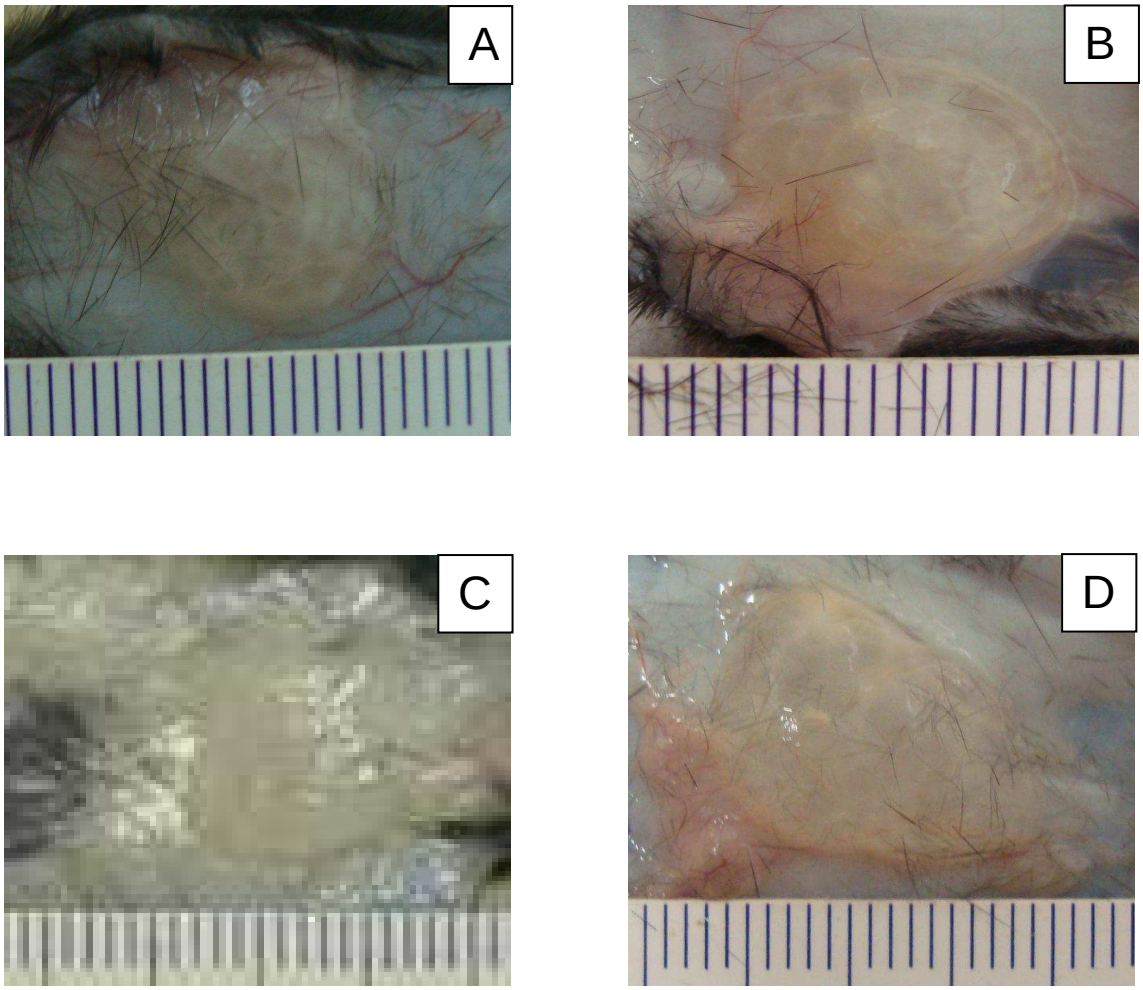


**Figura 7:** Macroscopia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO – A sete dias após a infecção: **A:**Subcutâneo de camundongo C57BL/6; **B:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ -KO. Aos 30 dias após a infecção: **C:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6; **D:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO. Escala em milímetros.

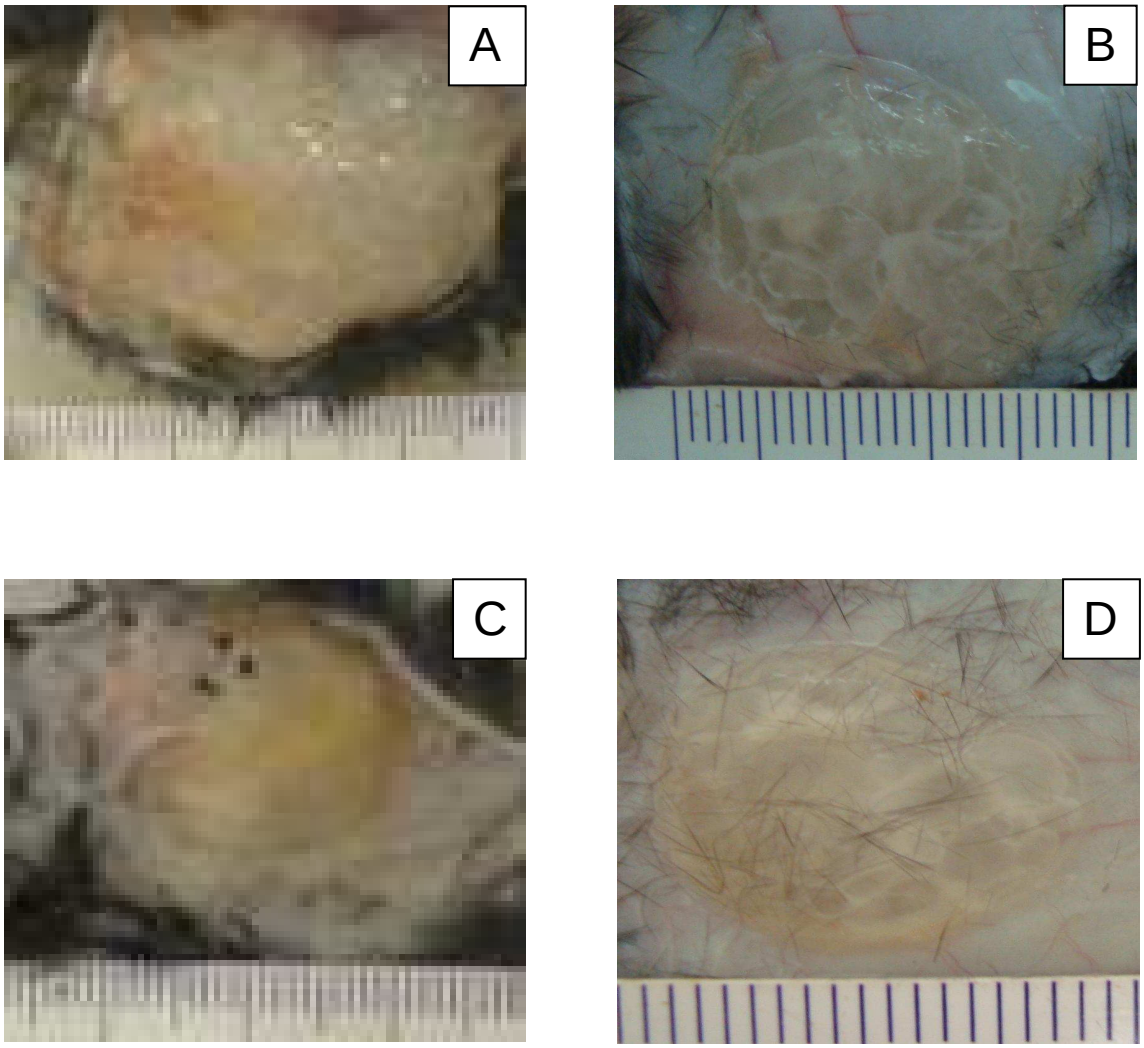


**Figura 8:** Macroscopia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ. KO Aos 60 dias após a infecção: **A:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6; **B:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO Aos 90 dias após a infecção: **C:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6; **D:** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ. KO - Escala em milímetros.

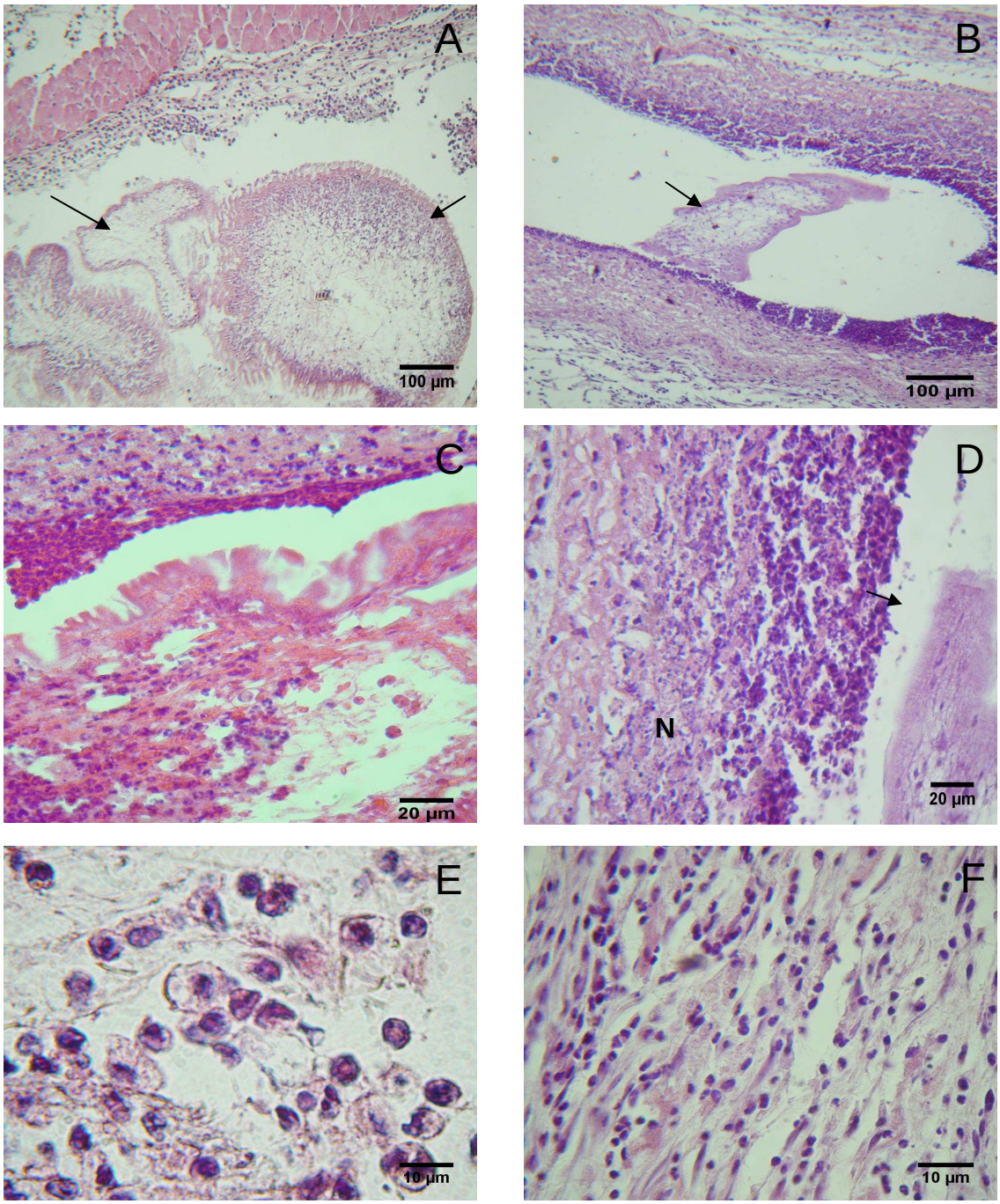


**Figura 9**: Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO - aos sete dias após a infecção**: A:** Subcutâneo de C57BL/6 com cisticercos em diferentes fases de desenvolvimento (seta) e infiltrado inflamatório ao redor do parasito (HE, barra =100µm) **B.** Subcutâneo de C57BL/6 IFNγ-KO apresentando cisticerco em fase larval (seta) de desenvolvimento, com infiltrado inflamatório e necrose ao redor do parasito (HE, barra = 100µm) **C**. Subcutâneo de C57BL/6 com necrose e infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro (HE, barra=20µm) **D**.Subcutâneo de C57BL/6 IFNγ-KO, apresentando cisticerco em fase inicial e larval (seta) de desenvolvimento, infiltrado inflamatório e necrose (N) na interface parasito-hospedeiro (HE, barra = 20µm) **E.** Subcutâneo de C57BL/6 com infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro com predominância de polimorfonucleares (HE, barra=10µm) **F.** Subcutâneo de C57BL/6 IFNγ-KO apresentando detalhe do infiltrado inflamatório acentuado de macrófagos e neutrófilos na interface parasito-hospedeiro (HE, barra=10µm).

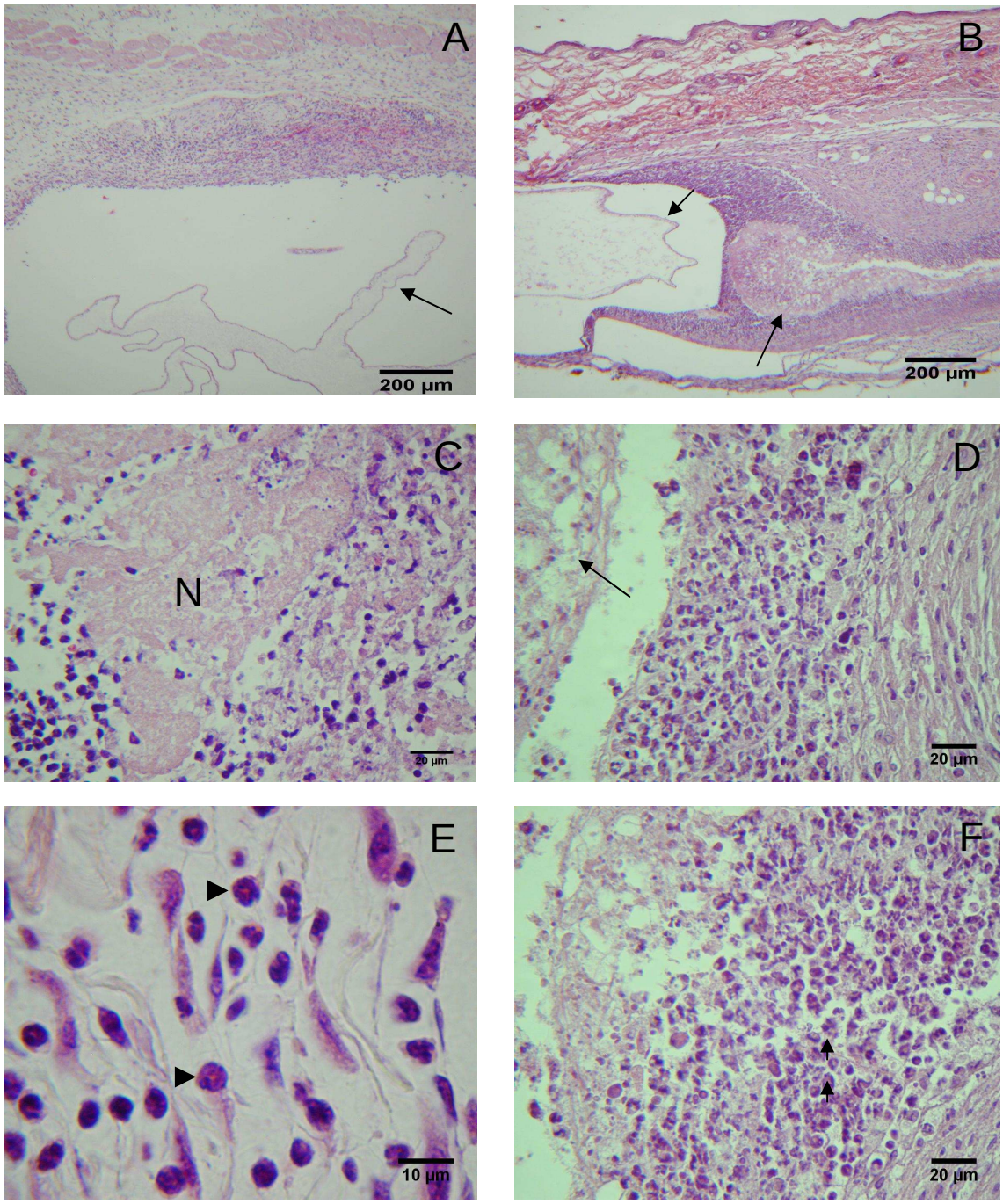


**Figura 10:** Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 - IFNγ -KO, aos 30 dias após a infecção: **A.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 onde observa-se cisticerco em fase inicial (seta) de desenvolvimento e infiltrado inflamatório acentuado na interface parasito-hospedeiro (HE, barra =200µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO - onde observa-se cisticercos em fase inicial e final (setas) e infiltrado inflamatório ao redor do parasito (HE,barra=200µm) **C.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6, onde observa-se necrose caseosa (N) e infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro (HE,barra=20µm) **D.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO -, onde observa-se detalhe demonstrando cisticerco (seta) e presença de colágeno na interface parasito-hospedeiro (HE, barra = 20 µm).**E.** Subcutâneo de camundongos C57BL/6 apresentando infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro com predomínio de polimorfonucleares (ponta de seta) (HE, barra=10µm) **F.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO - onde observa-se detalhe demonstrando infiltrado inflamatório acentuado constituído por polimorfonucleares (ponta de seta) e necrose no cisticerco (HE,barra=20µm).

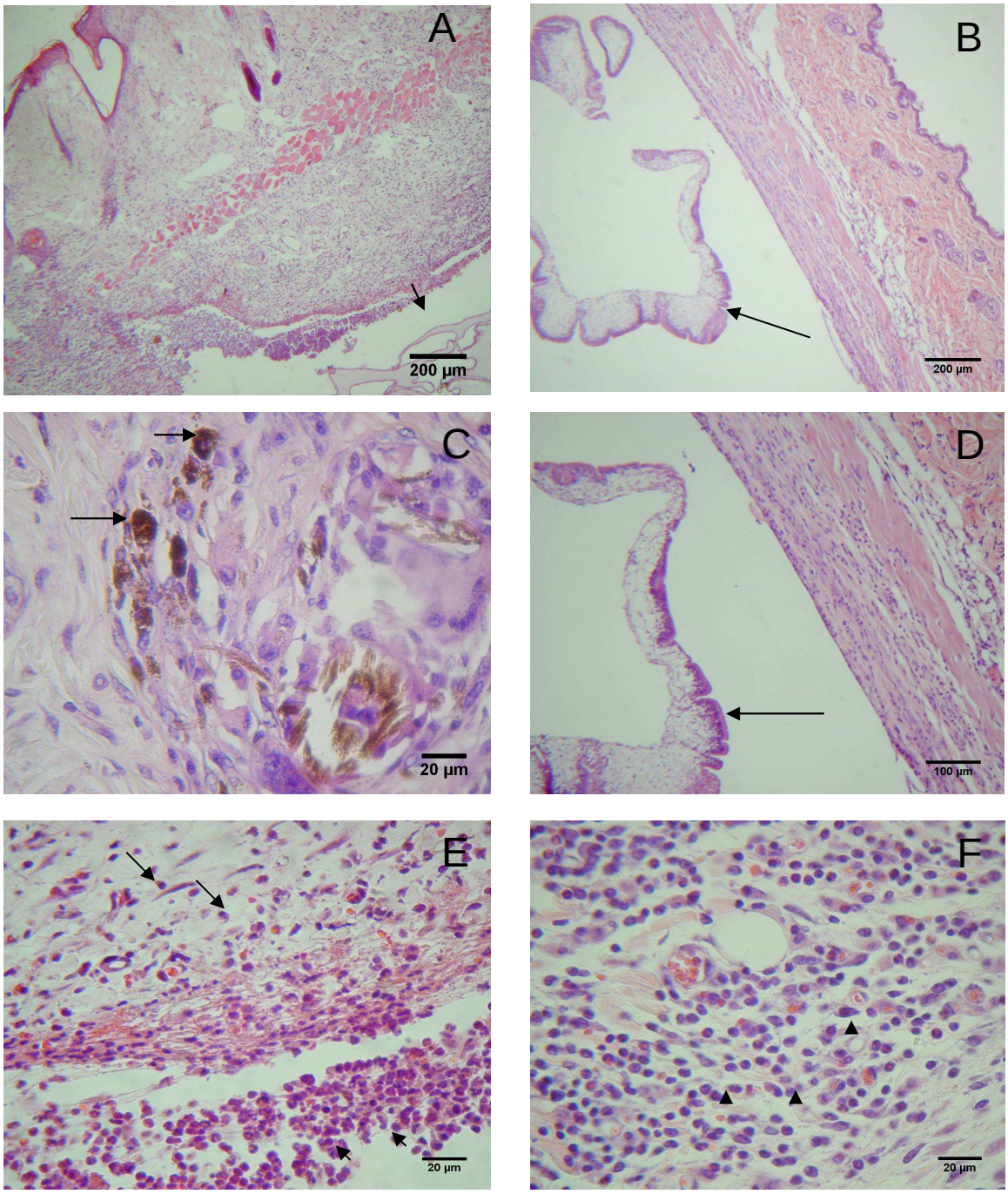


**Figura 11:** Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ -KO a 60 dias após a infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6 onde observa-se cisticerco em fase inicial de desenvolvimento (seta) e infiltrado inflamatório acentuado ao redor do parasito (HE, barra = 200µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ -KO-, onde observa-se cisticerco em fase inicial (seta) de desenvolvimento, e infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro (HE, barra= 200 µm) **C.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6, onde observa-se pigmentos de hemossiderina (seta) na interface parasito-hospedeiro (HE, barra=20µm) **D.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO- demonstrando cisticerco em fase inicial, infiltrado inflamatório ao redor do parasito e presença de colágeno (HE, barra = 100 µm) **E.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 demonstrando infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro, constituído por uma camada de mononucleares e outra de polimorfonucleares, esta última ao redor do cisticerco (HE, barra =20µm) **F.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO- demonstrando detalhe do infiltrado inflamatório constituído principalmente por polimorfonucleares(HE, barra = 20 µm).

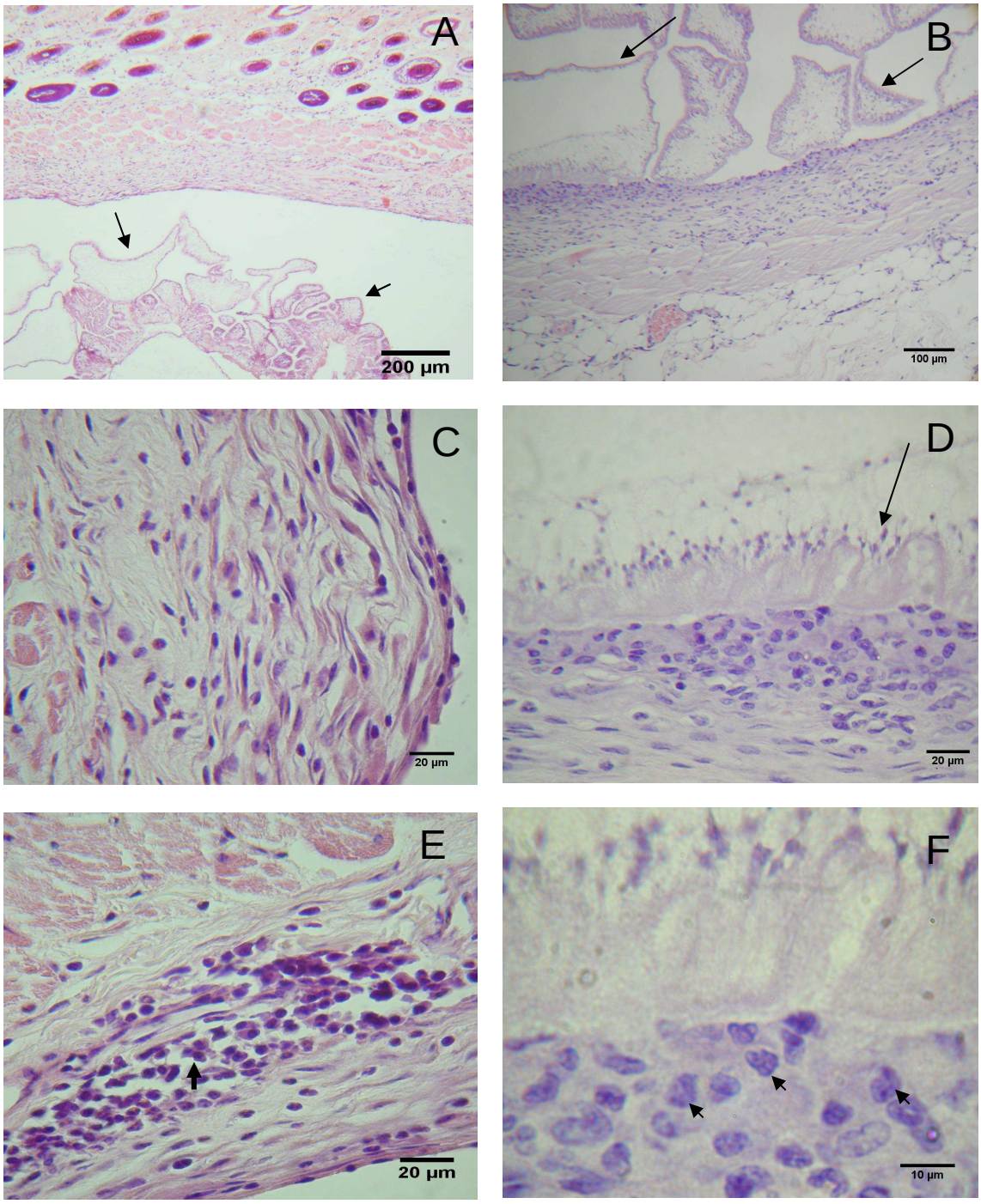


**Figura 12:** Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO a 90 dias após a infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6 onde observa-se cisticerco em diferentes fases de desenvolvimento (setas) e infiltrado inflamatório moderado ao redor do parasito (HE, barra = 200µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, onde observa-se cisticerco em diferentes fases de desenvolvimento (setas), e infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro (HE, barra= 100 µm) **C.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6, onde observa-se infiltrado inflamatório constituído de mononucleares, juntamente com colágeno na interface parasito-hospedeiro (HE, barra=20µm) **D.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO demonstrando cisticerco (seta), e infiltrado inflamatório em contato com o cisticerco, na interface parasito-hospedeiro (HE, barra=20µm) **E.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 demonstrando infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro, com presença de plasmócitos (ponta de seta) (HE, barra =20µm) **F.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO demonstrando detalhe do infiltrado inflamatório em contato com o cisticerco, na interface parasito-hospedeiro, constituído principalmente por mononucleares (setas) (HE, barra = 20 µm).

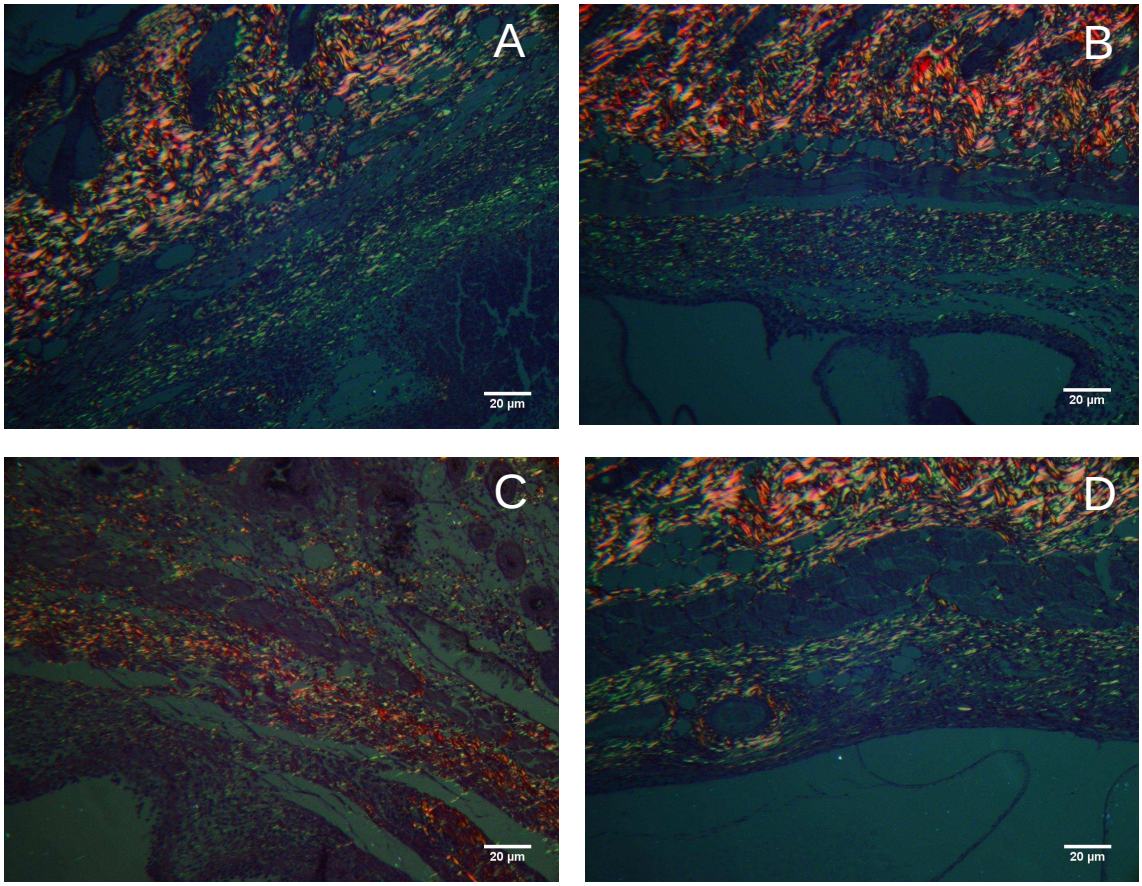


**Figura 13:** Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO. Aos sete dias após a infecção**: A.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6, onde observa-se colágeno tipo 3, na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO onde observa-se , colágeno tipo 3 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) Aos 30 dias após a infecção: **C.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6, onde observa-se a presença de colágeno tipo 3 e colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) **D.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ-KO, onde também observa-se a presença de colágeno tipo 3 e colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm).

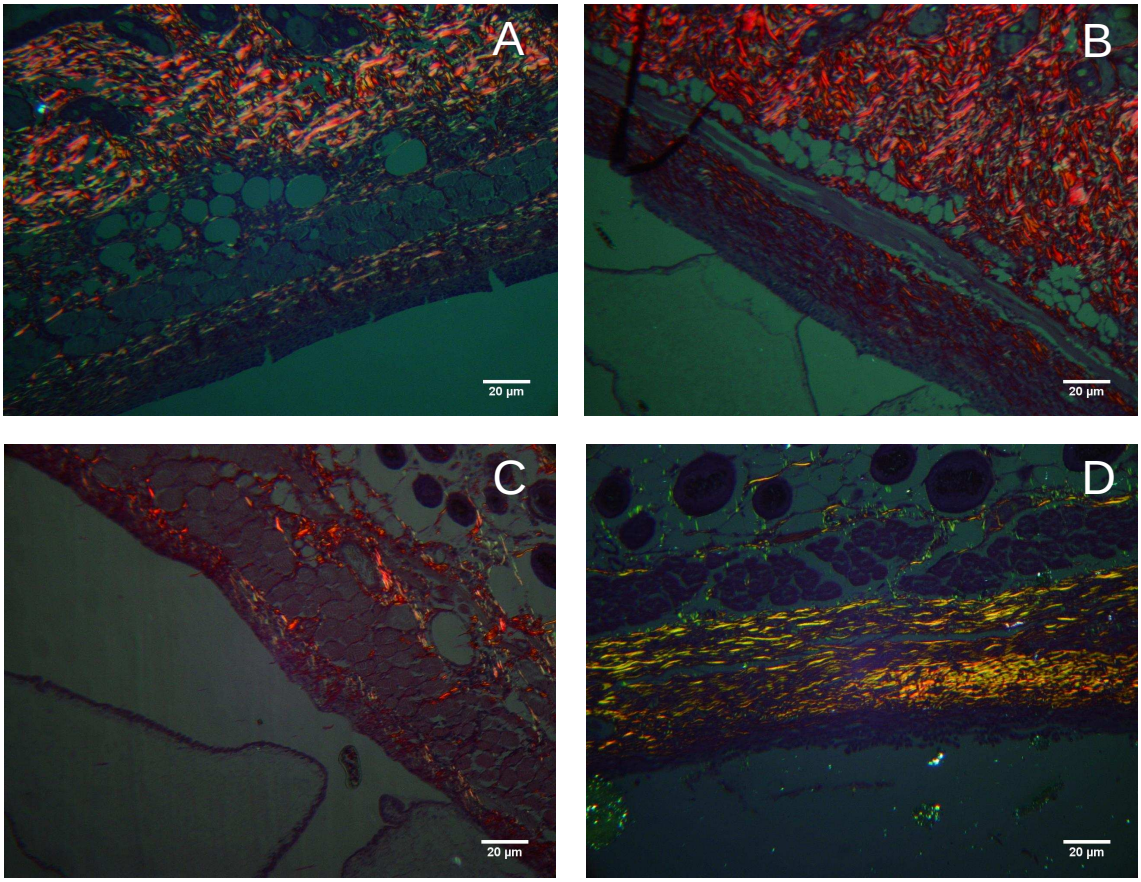


**Figura 14:** Fotomicrografia do subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ-KO. Aos 60 dias após a infecção**: A.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 onde observa-se a presença de colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ -KO, onde também observa-se a presença de colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) Aos 90 dias após a infecção **C.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 , onde observa-se presença de colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm) **D.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, onde também observa-se a presença de colágeno tipo 1 na interface parasito-hospedeiro (Picrosírius, barra = 20µm).

**3. Detecção de células CD301+ no subcutâneo infectado com cisticercos de *T. crassiceps*.**

Para analisar a presença de células CD301+ no subcutâneo, de camundongos infectados com cisticercos de *T. crassiceps,* foi realizada a imunoistoquímica.

Na linhagem C57BL/6, aos sete dias após a infecção, foi observada a presença discreta de células CD301+ no infiltrado inflamatório na interface parasito-hospedeiro, sendo que, estas se encontram localizadas em uma região distante do parasito, ao passo que as células que estão próximas ou em contato com o parasito foram caracterizadas como polimorfonucleares (Figura 15 A e 15 C). Na linhagem IFNγ - KO não foi observada a presença destas células durante os sete e 30 dias após a infecção (Figura 15B ,15D e 16 B ,16 D).

Aos 30 dias após a infecção, na linhagem C57BL/6, foi observada a presença acentuada de células CD301+ no infiltrado inflamatório da interface parasito-hospedeiro. Estas células estavam localizadas como descrito aos sete dias de infecção para esta linhagem (Figura 16 A e 16C). Aos 60 dias e aos 90 dias após a infecção, na linhagem C57BL/6, não foi observada a presença de células CD301 positivas (Figura 17 A, 17 C e 18 A, 18 C).

Na linhagem IFNγ - KO, aos 60 dias de infecção observamos a presença moderada de células CD301+ no infiltrado inflamatório da interface parasito-hospedeiro e estão localizadas em uma região mais próxima do parasito porém aparentemente não estão em contato com o mesmo (Figura 17B, 17D). Aos 90 dias após a infecção, nesta mesma linhagem, foi observada a presença acentuada de células CD301+ no infiltrado inflamatório da interface parasito-hospedeiro, entretanto estas células estão localizadas ao longo de todo infiltrado, inclusive próximas ao parasito (Figura 18B e 18D).

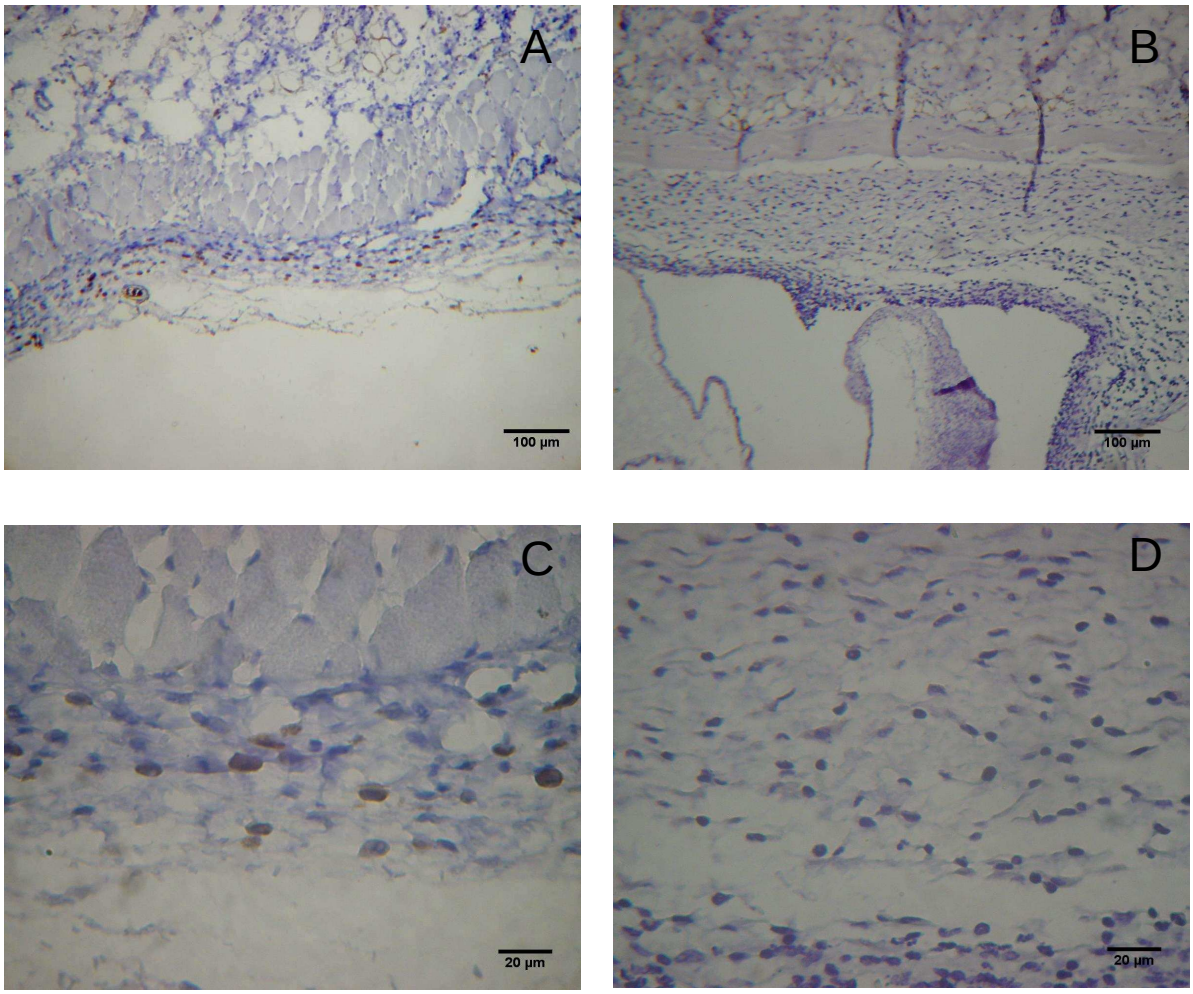


**Figura 15:** Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO. Aos sete dias de infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6, apresentando células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, apresentando ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **C**. Detalhe da figura A onde observa-se células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=20µm) **D.** Detalhe da figura B onde observa-se ausência de células CD301 positivas.

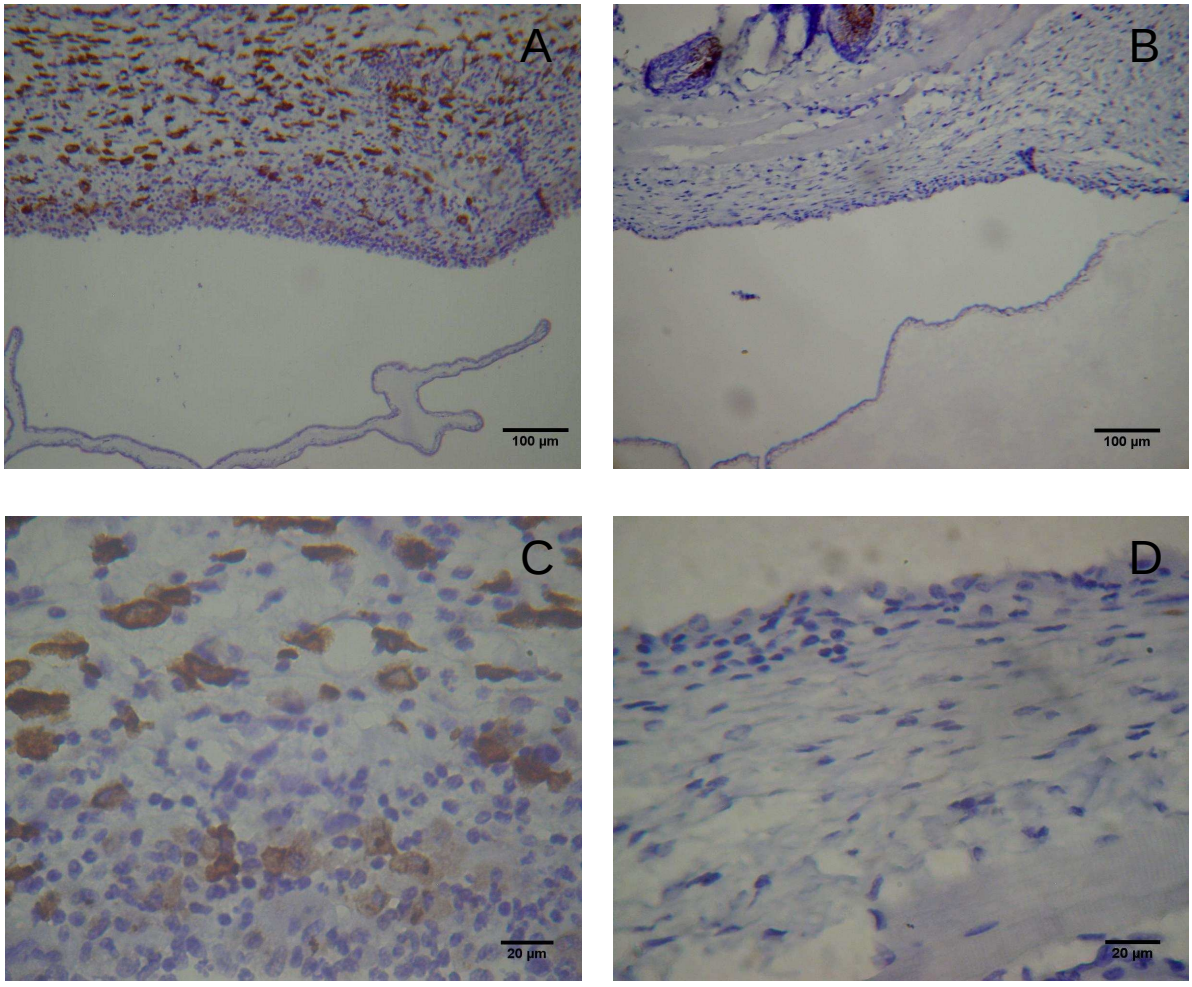


**Figura 16:** Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO. Aos 30 dias de infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6, apresentando células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, apresentando ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **C**. Detalhe da figura A onde observa-se células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=20µm) **D.** Detalhe da figura B onde observa-se ausência de células CD301 positivas.

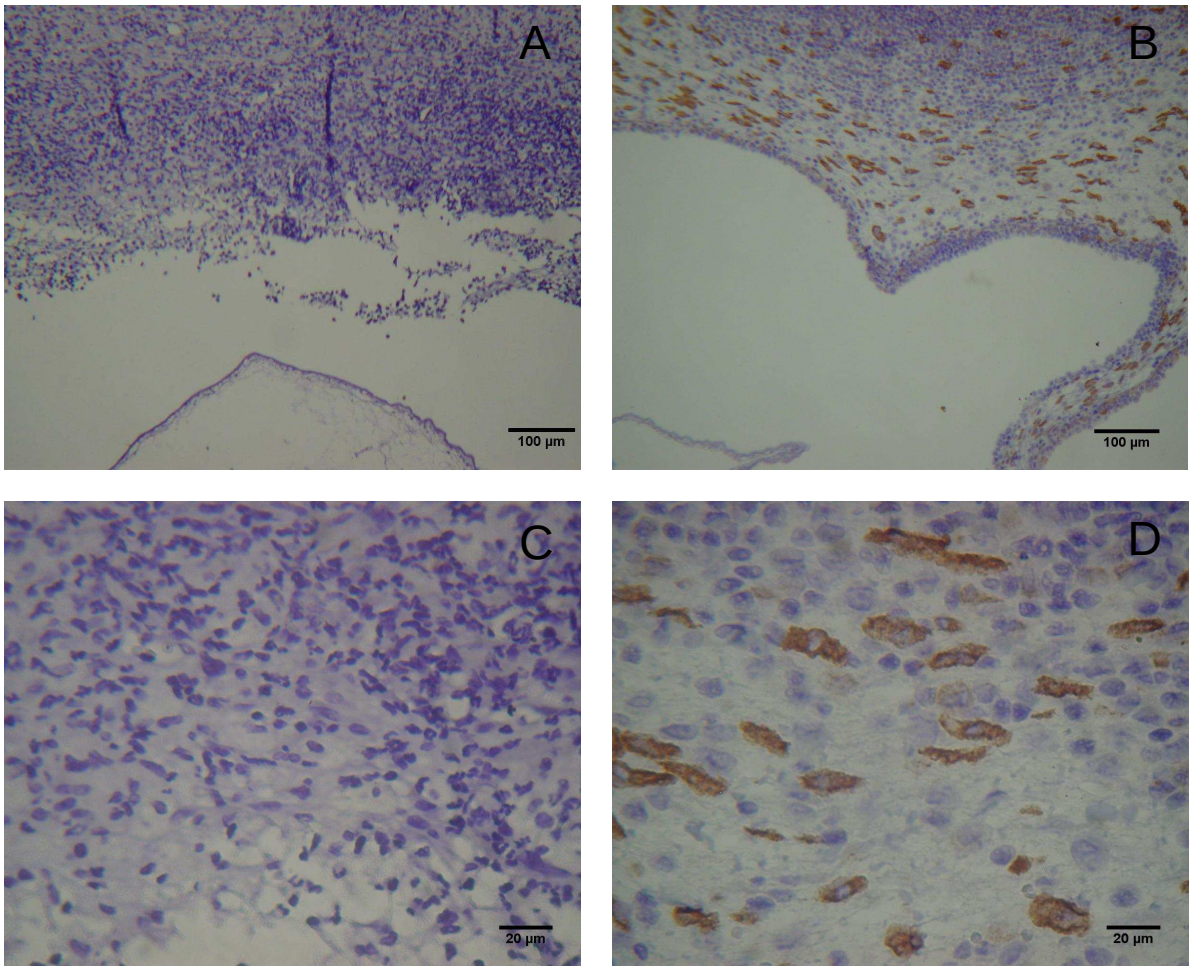


**Figura 17:** Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO. Aos 60 dias de infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6, apresentando ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, onde observa –se a presença de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **C**. Detalhe da figura A onde observa-se ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=20µm) **D.** Detalhe da figura B onde observa-se presença de células CD301 positivas.

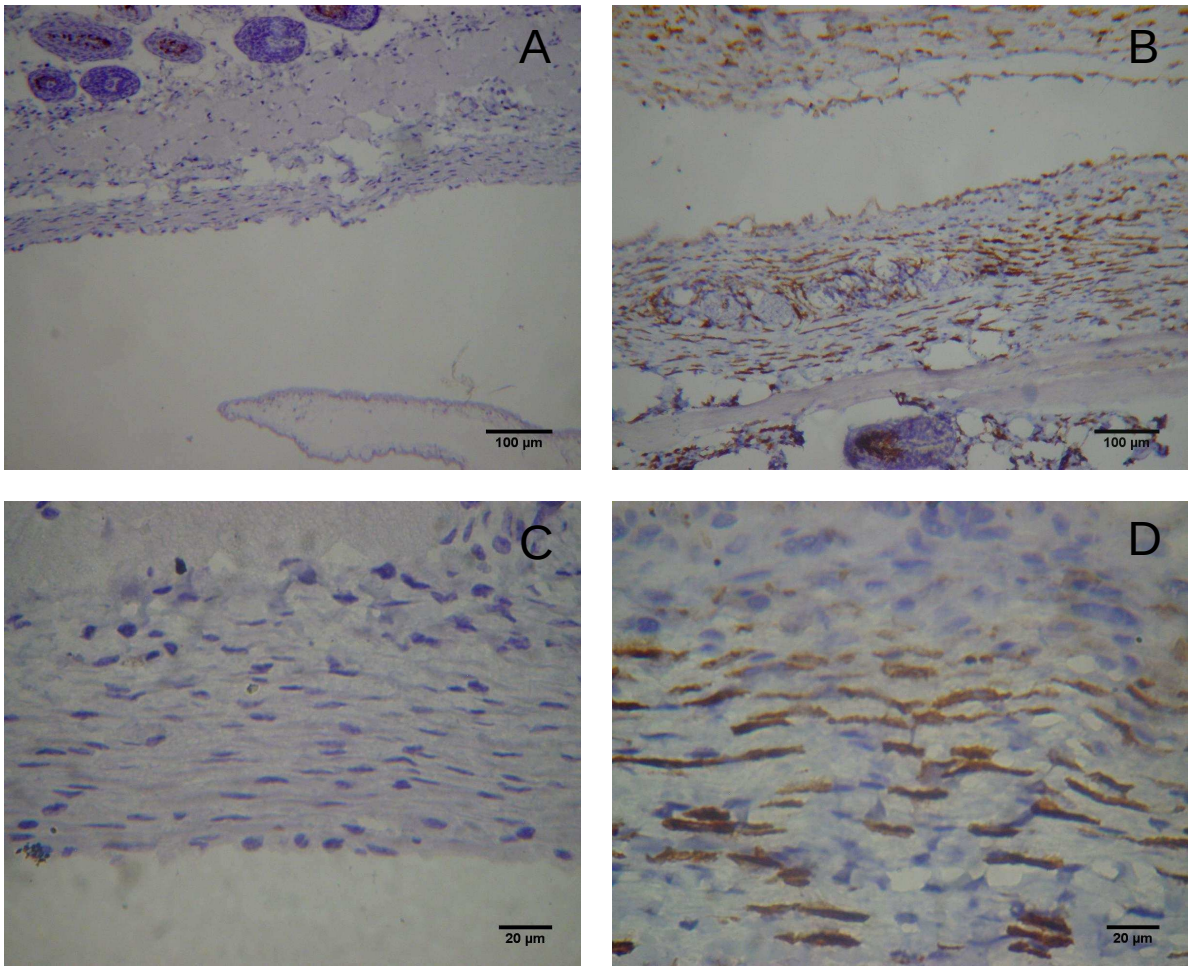


**Figura 18:** Imunoistoquímica para marcação de células CD301, no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ - KO. Aos 90 dias de infecção: **A**. Subcutâneo de camundongo C57BL/6, apresentando ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **B.** Subcutâneo de camundongo C57BL/6 IFNγ - KO, onde observa-se a presença de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=100µm) **C**. Detalhe da figura A onde observa-se ausência de células CD301 positivas (DAB/hematoxilina, barra=20µm) **D.** Detalhe da figura B onde observa-se presença de células CD301 positivas.

**4 Concentração sérica das citocinas IFNγ, IL-4 e IL-12p40.**

Para avaliar o perfil de resposta imune sistêmica desenvolvida frente à infecção por *T. crassiceps* foi realizada a coleta do sangue para a obtenção de soro e dosagem das citocinas IFNγ, IL-4 e IL-12p40.

Na linhagem de camundongos C57BL/6 a quantidade de IFNγ nos animais não infectados foi inferior ao limite de detecção da técnica do ELISA realizada (0,1ng/mL) durante todos os dias de infecção analisados. Nos animais infectados aos sete dias de infecção não foi detectada a presença de IFNγ, entretanto, observou-se aumento estatisticamente significante de IFNγ aos 30 (0,25 ± 0,2ng/mL), 60 (0,4 ± 0,1ng/mL) e 90 (0,76 ± 0,7ng/mL) dias após a infecção, quando comparado com seus controles (Figura 19).

Com relação a IL-4 a quantidade desta citocina no soro dos animais controle também foi inferior ao limite de detecção da técnica do ELISA (0,1 ng/mL) durante todos os dias de infecção analisados. Houve aumento significativo de IL-4 aos 30 (1,4 ± 0,7 ng/mL) e 60 (1,3 ± 0,3 ng/mL) dias após a infecção quando comparado com seus controles e também foi observado, um aumento significativo de IL-4 nos animais infectados aos 30 e 60 dias em relação aos sete dias de infecção (0,1 ± 0,06 ng/mL) (Figura 20).

Na análise da IL-12p40 foi observado um aumento significante desta citocina, apenas aos 30 dias (1,3 ± 0,05 ng/mL) após a infecção quando comparados com seu controle (0,7 ± 0,1 ng/mL) (Figura 22)

Na linhagem IFNγ - KO não foi detectado IFNγ dos animais infectados e controles ao longo da infecção, a falha na produção desta citocina nestes animais foi confirmada pela ausência da mesma após estimulação de esplenócitos com Concanavalina A (ConA) (dados não mostrados). A IL-4 não apresentou aumento estatisticamente significante aos 07, 60 e 90 dias após a infecção em relação aos controles, porém aos 30 dias seu aumento foi detectado (0,92 ± 1,2 ng/mL $p < 0,05$) (Figura 21). Com relação a IL-12p40 não foi observado nenhum aumento estatisticamente significante (Figura 23).

Foi observado também aumento significante na quantidade de IL-4 nos animais infectados da linhagem C57BL/6 (1,2 ± 0,8 ng/mL) em relação ao infectados da linhagem IFNγ -KO (0,3 ± 0,2 ng/mL), ambos aos 60 dias de

infecção (Figura 20 e 21). A IL-12p40 também demonstrou aumento significante nos animais infectados da linhagem C57BL/6 aos sete dias (0,9 ± 0,3 ng/mL), 30 dias (1,3 ± 0,05 ng/mL) e 60 dias (1,9 ± 1,2 ng/mL) em relação aos infectados da linhagem IFNγ-KO nestes mesmos dias experimentais respectivamente (0,4 ± 0,1ng/mL), (0,6 ± 0,4 ng/mL) (0,5 ± 0,1 ng/mL) (Figura 22 e 23).

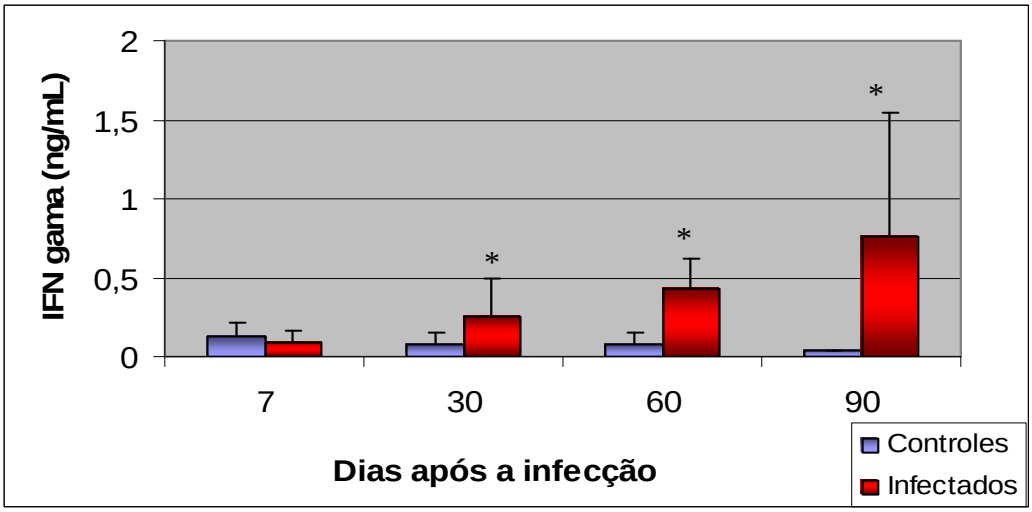


**Figura 19.** Concentração de IFNγ no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps.* * $p < 0,05$ (controle *vs* infectado) n = 6, os dados representam média ± desvio padrão.

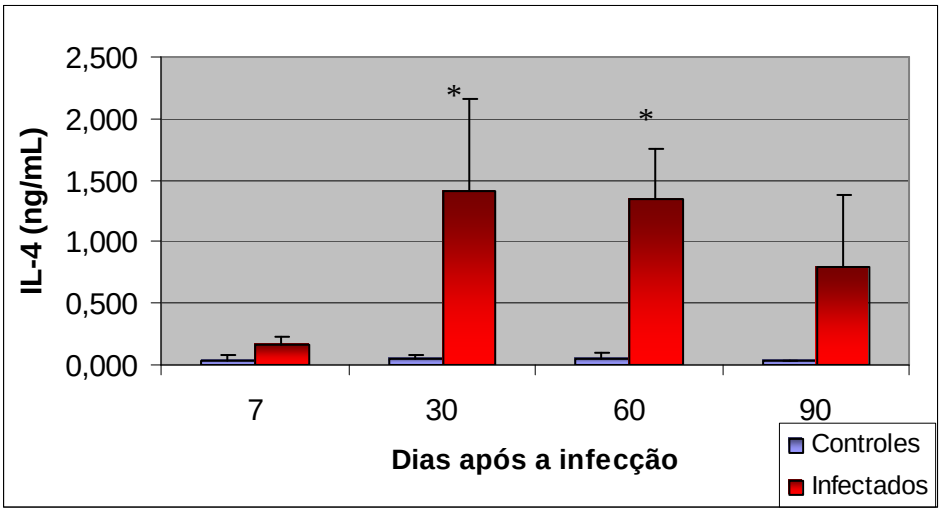


**Figura 20** Concentração de IL-4 no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps.* * p < 0,05 (controle *vs* infectado) n = 6, os dados representam média ± desvio padrão.

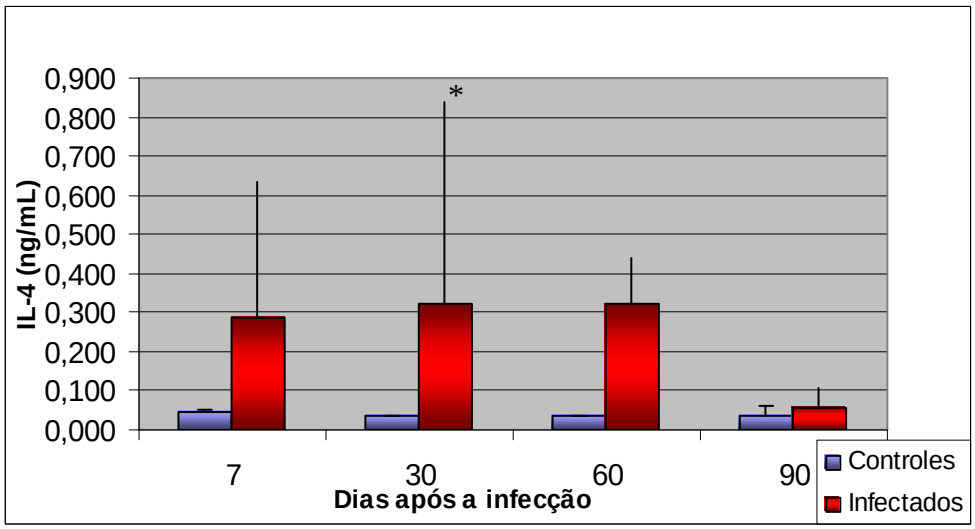


**Figura 21.** Concentração de IL-4 no soro de camundongos C57BL/6 IFNγ - KO infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps.* * p < 0,05 (controle *vs* infectado) n=6, os dados representam média ± desvio padrão.

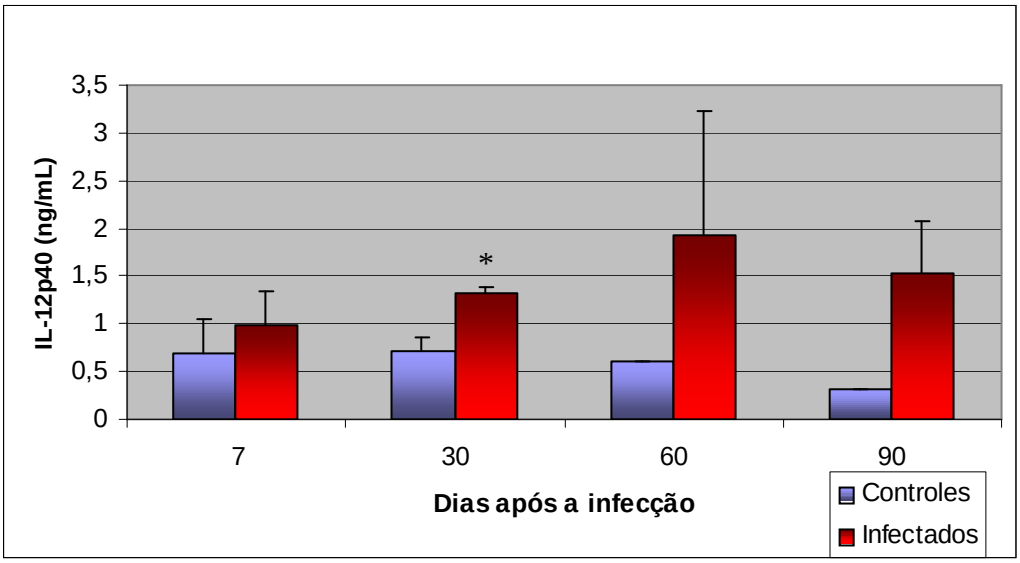


**Figura 22:** Concentração de IL-12p40 no soro de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps.* * p < 0,05 (controle *vs* infectado) n=6, os dados representam média ± desvio padrão

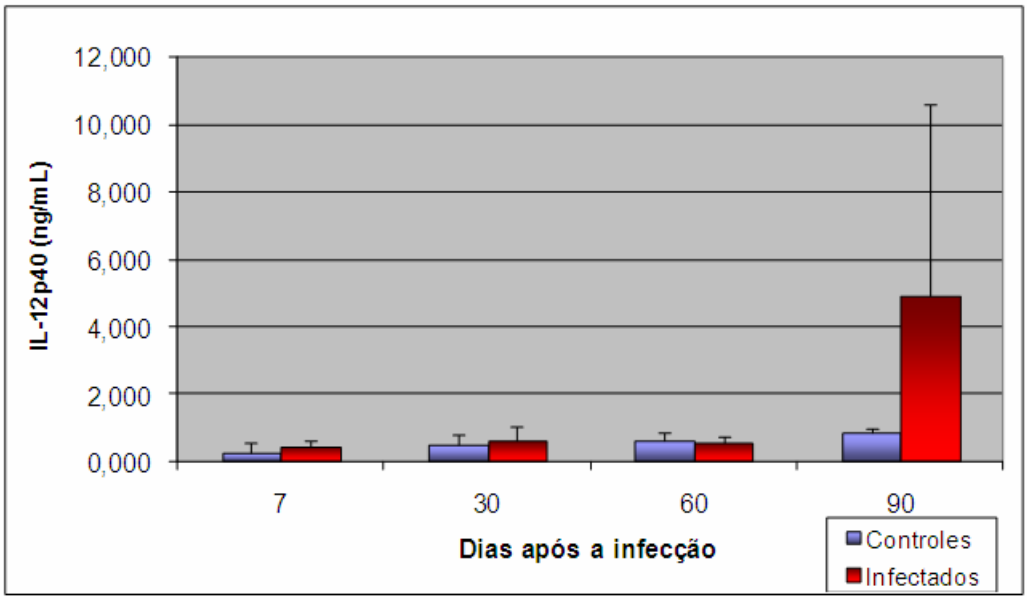


**Figura 23:** Concentração de IL-12p40 no soro de camundongos C57BL/6 IFNγ - KO infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps.* * p < 0,05 (controle *vs* infectado) n = 6, os dados representam média ± desvio padrão.

# *DISCUSSÃO*

No presente trabalho, utilizou-se a infecção experimental com cisticerco de *T. crassiceps* no subcutâneo como modelo de estudo da cisticercose humana ocasionada por *T. solium.* O nome *Cysticercus* proposto por Linnaeus é derivado de palavras gregas *kustis* (cisto, vesícula) e *kercos* (cauda). O termo *cellulosae* foi proposta por Rudolphi em 1809, baseado na freqüente localização do cisticerco na região subcutânea (Pitella, 1997).

Em seres humanos a cisticercose por *T. solium* no subcutâneo tem sido relatada em diferentes trabalhos (Vianna et al 1991, Vianna 1986, Miura et al 2000). Além da cisticercose por *T. solium*, já foram relatados casos em seres humanos de cisticercose por *T. crassiceps* no subcutâneo e tecido muscular (Heldwein et al 2006).

No modelo de infecção clássico, utiliza-se a injeção de cerca de 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial, na cavidade peritoneal, onde os parasitos normalmente se desenvolvem em camundongos BALB/c, mas são controlados com aproximadamente 30 dias em C57BL/6 (Fragoso et al 2008). No modelo proposto no presente trabalho utilizou-se camundongos C57BL/6 geneticamente resistentes à infecção por *T. crassiceps* (Terrazas et al 2008, Fragoso et al 2008) o que justifica-se, pelo fato de ser um modelo que mais se aproxima do que ocorre na cisticercose humana e também por não ter sido relatado na literatura casos de cisticercose intraperitoneal por *T. solium* em seres humanos.

Propôs-se também verificar o papel do IFNγ no curso desta infecção experimental, pois o IFNγ é produzido principalmente por células NK durante a resposta imune inata e por linfócitos T CD4+ do tipo Th1 durante a resposta imune adquirida. Esta citocina é a principal ativadora de fagócitos para que estes tenham um aumento na sua capacidade microbicida (Martinez et al 2009).

A IL-4 está relacionada à um perfil Th2 da resposta imune adquirida, que é tipicamente caracterizada por aumentar os níveis desta citocina e de outras citocinas Th2, bem como ativação e expansão de plasmócitos, secreção de IgE, eosinófilos, mastócitos e basófilos (Anthony et al 2007). A IL-4 é também, associada à ativação de macrófagos alternativamente ativados, os quais têm um menor potencial microbicida (Mosser et al 2008).

Na lesão provocada no subcutâneo, observou-se o parasito em todas as fases de desenvolvimento, sendo cisticercos em fase inicial, mais predominante no início da infecção (sete e 30 dias após a infecção). Além disso, o número de cisticercos aumentava no interior da vesícula que também aumentava de tamanho à medida que a infecção progredia. Porém, a vesícula e a quantidade de cisticercos presentes regrediram no último dia experimental avaliado. Por outro lado, na deficiência de IFNγ a quantidade de cisticercos em fase inicial e larval foi maior, sendo que seu crescimento não foi controlado pelo hospedeiro. Este fato indica que o IFNγ pode ser importante na destruição do parasito no subcutâneo.

O IFNγ presente no soro dos animais convencionais no início da infecção aumentou significantemente até o final do período experimental. De acordo com a literatura o IFNγ é conhecido por ser uma citocina ativadora de fagócitos, para que assim, estes tenham um aumento na sua capacidade microbicida (Martinez et al 2009). A IL-4 também foi detectada no início da infecção no soro dos animais. Outros autores descreveram que esplenócitos, células do linfonodo ou células da cavidade peritoneal quando estimuladas com antígenos do cisticerco foram capazes de produzir IFNγ e IL-4 nas fases iniciais da infecção (Reyes et al. 2009; Rodriguez-Sosa et al. 2002; Toenjes 2003; Toenjes et al. 1999). De acordo com os dados acima, acredita-se que a presença do parasito no subcutâneo induz uma resposta mista Th1/Th2, desta forma, a morte do parasito poderia estar ocorrendo por aumento da atividade microbicida de macrófagos, via eixo Th1 ou pelos mecanismos Th2 clássicos.

Aparentemente, uma resposta Th1 é mais importante que a resposta Th2 no controle da infecção por *T. crassiceps*, pois de acordo com a literatura, camundongos deficientes em STAT6 (um importante fator de transcrição responsável pela geração do perfil Th2), que apresentavam cisticercose experimental intraperitoneal, desenvolveram uma forte resposta Th1 e controlaram a infecção (Rodriguez-Sosa et al 2002), ao passo que camundongos deficientes em STAT4 (fator de transcrição responsável pela geração do perfil Th1) mostraram-se suscetíveis a infecção (Rodriguez-Sosa et al 2004). No entanto, alguns estudos demontraram que IFNγ e IL-4 podem

atuar no sítio inflamatório aumentando a capacidade fagocítica de macrófagos (Raveh et al 1998).

A produção de IL-4 também estava menor no soro dos animais deficientes em IFNγ infectados, o que mantém a possibilidade de que um efetivo controle do parasito seja dependente também de IL-4. Portanto, acredita-se que a ausência do IFNγ estaria relacionada com o favorecimento da indução de uma resposta imune, principalmente Th2 constatada pela presença sérica desta citocina na infecção. De acordo com Rodriguez-Sosa et al. (2002) os helmintos, como a *T. crassiceps* são hábeis em induzir respostas Th2, fato que fortalecem os achados deste trabalho.

O granuloma secundário observado no início da infecção foi constituído por neutrófilos localizados próximos ao parasito e alguns macrófagos mais distais. Na deficiência de IFNγ, observou-se eosinófilos, neutrófilos e macrófagos compondo um granuloma terciário. Estes achados indicam que o IFNγ exerce um papel importante na organização do granuloma, pois a presença de neutrófilos microbicidas na linhagem convencional se deve a resposta Th1. Por outro lado, o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos na ausência do IFNγ, é devido a resposta Th2 estabelecida, estando esses dados de acordo com a literatura (Anthony et al 2007).

Os macrófagos presentes no granuloma, no início da infecção foram identificados como células CD301+ que provavelmente promoveram a formação de uma cápsula fibrosa espessa envolvendo os parasitos. De acordo com a literatura, os macrófagos CD301+ são caracterizados como células residentes da derme ou alternativamente ativados, que possuem baixo poder microbicida e estão associados a tolerância e controle da resposta imune inflamatória Th1 que pode contribuir para a patogênese da infecção (Hayashi et al 1999, Mantovani et al 2002, Liu et al 2004, Dupasquier et al 2006).

O papel dos macrófagos alternativamente ativados também foi estudado na esquistossomose experimental por *S. mansoni* em camundongos deficientes para a cadeia alfa do receptor de IL-4 (IL-4Rα $^{-/-}$). Essas células ativadas via IL/4IL13 foram essenciais na imunossupresão e sobrevivência do animal na fase aguda, pois, o potencial destrutivo da inflamação granulomatosa é

contrabalanceada pela ativação de macrófagos alternativamente ativados (Herbert at al 2004).

Na deficiência de IFNγ não houve a diferenciação de macrófagos CD301+ o que induziu a formação de uma cápsula fibrosa delgada no inicio da infecção. De acordo com a literatura os macrófagos alternativamente ativados possuem uma importante função no reparo tecidual, e que a ativação de macrófagos via IL-4 aumenta a produção de proteínas da matriz extracelular (Kreider et al 2007, Mosser et al 2008).

Na fase tardia da infecção (60 e 90 dias após a infecção) o IFNγ foi detectado com maior concentração do que no início da infecção, enquanto que a concentração de IL-4 não se alterou. Estes dados reforçam a idéia de que o perfil imune misto Th1/Th2 está presente durante todo o período experimental avaliado. Outro estudo também encontrou o mesmo padrão de citocinas em fases tardias da cisticercose experimental intraperitoneal (Toenjes at al 2003) O perfil de citocinas presentes no granuloma formado na cavidade peritoneal de camundongos que apresentavam cisticercose experimental, demonstraram que IFNγ e IL-4 também estavam presentes em granulomas tardios (Robinson et al 1997).

Na deficiência de IFNγ, a concentração de IL-4 diminui na fase tardia da infecção, promovendo a sobrevivência do parasito. Apesar da diminuição da IL-4 há outro perfil imune independente do perfil Th2, ainda não esclarecido no presente estudo. Tal perfil imune, juntamente com a resposta Th2, controlou o crescimento parasitário e promoveu a morte de parasitos ocorrendo, portanto, o estabelecimento de um equilíbrio parasito-hospedeiro. Acredita-se o perfil Th17 que é caracterizado como pró-inflamatório (Korn et al. 2009) ou T regulador que apresenta uma atividade imunomoduladora (Germain et al. 2008) possam estar envolvidos nesta resposta.

O granuloma durante a fase tardia da infecção constituía-se por macrófagos, alguns plasmócitos e polimorfonucleares, essas últimas, em contato com o parasito. Acredita-se que os polimorfonucleares e os macrófagos presentes nessa fase foram responsáveis pela morte parasitária por meio de seu potencial microbicida. Na deficiência de IFNγ, houve um aumento de macrófagos, os quais estavam em contato com o parasito. Estes macrófagos

foram caracterizados como CD301+, que em contato com o parasito podem ter sido responsáveis pela produção de colágeno. Este colágeno promoveu o isolamento do parasito impedindo fisicamente sua proliferação. Este dado pôde ser evidenciado pelo aumento de colágeno circundando os cisticercos na ausência de IFNγ. De acordo com a literatura os macrófagos alternativamente ativados (CD301+), estão frequentemente associados com remodelamento do tecido e reparo tecidual, e que a maioria das células intersticiais dérmicas são macrófagos e não fibroblastos, e que a síntese de componentes da matriz extracelular por macrófagos é bem conhecida (Dupasquier et al 2006).

Ainda na deficiência de IFNγ, os polimorfonucleares localizados próximos ao parasito no presente trabalho, sugere a existência de um perfil imune Th2/Th17. De acordo com Fadok et al (1998) o alto recrutamento de polimorfonucleares para os tecidos está associado á presença de IL-17, uma citocina produzida pelo perfil imune Th17. Em contrapartida a retirada de restos apoptóticos de polimorfonucleares pelos macrófagos durante a inflamação pode levar a inibição da mesma devido em parte a produção de TGFβ, uma citocina reguladora.

Outro perfil imune possivelmente participante desta resposta imune são os perfis imunes Th2/Treg, com associação de macrófagos reguladores e macrófagos alternativamente ativados (CD301+), pois, de acordo com a literatura, uma subpopulação de macrófagos produtora de IL-10 tem sido descrita como macrófagos reguladores, e são induzidos por meio da estimulação pela IL-10 e glicocorticoides produzidos pela glândula adrenal (Mosser et al 2008, Edwards et al. 2006). Para o melhor entendimento desta relação parasito-hospedeiro, é importante ressaltar que outros trabalhos ainda devem ser realizados para elucidar o papel das células Th17 e T reguladoras na cisticercose experimental subcutânea.

No presente estudo, avaliou-se a resposta inflamatória local e a resposta imune sistêmica frente à cisticercose experimental por *T. crassiceps*. Observou-se que a infecção não influenciou os índices da série vermelha, plaquetária e leucocitária, o que provavelmente se deve ao tipo de infecção, pois a infecção do subcutâneo é restrita a este local, a qual pode ter sido insuficiente para induzir alteração destas séries, a nível circulatório. Não foram

encontrados trabalhos na literatura que relatassem alterações no hemograma, relacionados com a cisticercose.

# *CONCLUSÃO*

Em conclusão, na presença de IFNγ, houve o controle do crescimento parasitário, determinado pelo estabelecimento de um perfil imune sistêmico misto Th1/Th2. Este perfil imune também induziu localmente a formação de granulomas,os quais eram constiuídos por células importantes na destruição parasitária, e por células CD301+ no início da infecção, que foram associadas ao controle do eixo Th1 da resposta mista desenvolvida. Em contrapartida, a ausência de IFNγ, favoreceu o crescimento parasitário e o desenvolvimento de uma resposta imune sistêmica Th2. Esta resposta imune influenciou na formação local de um granuloma, com a presença de macrófagos CD301+, que foram importantes na síntese de colágeno dificultando o crescimento dos parasitos.

# *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Abbas KA, Lichtman HA 2005. *Imunologia Celular e Molecular.* Guanabara Koogan, Elsevier Editora, São Paulo,: 368-372.
2. Acha P, Szifres B 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *OPS/OMS 2:* 989.
3. Ansem D, Spilianakis CG, Flavel RA 2009. How are Th1 and Th2 effector cells made?. *Curr. Opin. Immunol 21*:153–160.
4. Anthony MR, Rutitzky IL, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC 2007. Protective immune mechanisms in Helminth infection.*Nat Rev Immunol 7*: 975-987.
5. Arocker ME, Huber SV, Auer H, Grabner G, Stur M 1992. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye. A case report. *Klin Monatsbl Augenheikd 201*:34-37.
6. Arocker-Mettinger e, Huber-Spitzy V, Auer H, Grabner G, Stur M 1992. Taenia crassiceps in the anterior chamber of human eye. A case report. *Klin Monatsbl Augenheilkd 201:*34-37.
7. Ballek D, Takla M, Ising-Volmer S, Stoye M 1992. The Helminth fauna of red foxes (Vulpes Vulpes Linnaeus 1758) in north Hesse and east Westphalia. 1. Cestodes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr 99*: 362-365
8. Berczi I., Chalmers IM., Nagy E., Warrington RJ 1996. The immune effects of neuropeptides. *Baillieres Clin. Rheumatol. 10*: 227–257.
9. Bierdermann T, Röchen M, Carballido JM 2003. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell Mediated Immune Responses of the Skin. *Jid Symposium Proceedings 9*: 4-10.
10. Boyton RJ, Altmann DM, 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol 23:* 526-529.
11. Brojer CM, Peregrine AS, Barker IK, Carreno RA, Post C 2002. Cerebral cysticercosis in a Woodchuck (*Marmota monax*). *J Wildl Dis.38* :621-624.
12. Bueno EC, Machado RL, Livramento JA, Vaz AJ 2004. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). *Act Trop 91:* 205-213.
13. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, LI YS, Ellis MK, McManus DP 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol 31:* 163-176.

14. Carrada-Bravo T 1987. Teniasis-cisticercosis como problema de salud pública. *Bol Med Hosp Infant Mex 44:* 427-434.
15. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ 2007.Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin. Immunol 19:* 400-408.
16. Chimelli L, Lovalho AF, Takayanagui OM 1998. Contribuição da necropsia na consolidação da notificação compulsória. *Arq Neuropsiquiatr 56:* 577-584.
17. Corona T, Pascoe D, Gonzalez- Barranco D 1986. Anticysticercus antibodies in serum and cerebro spinal fl uid in patients with cerebral cysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 49*: 1044–1049.
18. Deblock S, Petavy AF 1983. Hepatic larvae of cestode parasites of vole rat *Arvicola terrestris* in Auvergne, France. *Ann Parasitol Hum Comp.58* :423-432
19. Del Brutto OH, Sotelo J 1988. Neurocysticercosis: *An update. Reviews of Infect Diseases 10*: 1075-1087.
20. Dupasquier M, Stoitzner P, Wan H, Cerqueira D, Van Oudenaren A, Voerman JSA, Denda-Nagai K, Irimura T, Raes G, Romani N, Leenen PJM 2006. The dermal microenviroment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 singnaling. *J. Leukb. Biol 80*: 838-849.
21. Dyer NW, Greve JH 1998. Severe *Cysticercus longicollis* in black lemur (*Eulemur macaco macaco*). *J Vet Diagn Invest 10:* 362-364
22. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophages population. *J. Leukoc. Biol 80:* 1298-1307.
23. Esch GW, Smyth JD 1976. Studies on the in vitro culture of *Taenia crassiceps. Internt. Journ. Paras 6:* 143-149.
24. Fadok VA 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells invitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-β, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest. 101:* 890-898.
25. Ferrari MBG, Rodriguez, R 2004. Prevalência de helmintíases em apêndices cecais. *Bras. Cir 31*:77-82.

26. Filho GB, 2006. Bogliolo Patologia. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 1346-1347.
27. Finkelman DF, Shea – Donohue T, Goldhill J, Sullivan AC, Morris CS, Maddens BK, Gause CW, Urban Jr FJ 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.15:* 505-533.
28. Finkelman DF, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF 1999. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol 11(4):*420-426.
29. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol 4:* 330-336.
30. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity 22:* 329-341.
31. Fragoso G, Meneses G, Sciutto E, Fleury A, Larralde C 2008. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasites lines. *J. Parasitol 94:* 551-553.
32. François AMD, Favennec LPD, Cambon-Michot CMD, Gueit IMD, Biga Norman MD, Tron FMD, Ph.D BPMD, Ph.D Hemet JMD 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am J Surg Pathol 22* :488-492
33. Freeman RS 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool .40*:.969-990.
34. Galioto AM et al 2006. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptative protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect. Immun 74*: 5730 – 5738
35. Gemmel M, Matyas Z, Pawlowski Z 1983. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. *WHO:* 207.
36. Gemmel MA, Lawson JR 1982. Ovine cysticercosis: an epidemiological model for the cysticercosis I Free-living egg fase. *New York Academic*: 87-98.

37. Germain RN 2008. Special regulatory T-cell review: A rose by any other name: from suppressor T cells to Tregs, approbation to unbridled enthusiasm*. Immunol 123:* 20-27.
38. Gomez-Escobar N, Gregory WF, and Maizels RM 2000. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of Caenorhabditis elegans daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of Brugia malayi. *Infect Immun 68:* 6402-6410.
39. Hayashi N, Matsui K, Tsutsui H, Osada Y, Mohamed RT,Nakano KashiwamurS, Hyodo Y, Takeda K, Akira S et al.:Kupffer cells from Schistosoma mansoni infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens 1999. *J Immunol 163*:6702-6711.
40. Heldwein K, Bierdermann HG, Hamperl WD, Bretzel G, Loscher T, Laregina D, Frosch M, Buttner DW, Tappe D 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg 75*: 108-111.
41. Herbert R De'Broski, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F. 2004. Alternative Macrophage Activation is essencial for survival during Schistosomiais and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity 20:* 623-635.
42. Hermánek J., Prokopic J.1989. Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. *Folia Parasitol (Praha)36 :*331-340.
43. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, and Wynn TA 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol 167:* 6533-6544.
44. Hewitson PJ, Grainger RJ, Maizels MR 2009. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol. 167*: 1–11.

45. Hölzl MA, Hofer J, Steinberger P, Pfistershammer K, Zlabinger GJ 2008. Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. *Immunol Lett 15:* 119(1-2).
46. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science 299:*1057-1061.
47. Huggins D 1989. Teníases. *Pediatr Moderna 24:* 251-256.
48. Jackson AJ, Friberg MI, Little S, Bradley EJ 2008. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology 126*: 18–27.
49. Jetten MA 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas 7:* 1-32.
50. Kanangat S, Blair PR, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, Wilkinson E 1996. Disease in the scurfy mouse is associated of cytokine genes. *Eur. J. Immunol 26:* 161-165.
51. Katamura K, Yamauchi T, Fudui T, Ohshima Y, Mayumi M, Furushi K 1995. Prostaglandin E2 at priming of naïve CD4+ cells inhibitd acquisition of ability to produce IFN gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol 155:* 4604-4612.
52. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol 4:* 337-342.
53. Kim HP, Leonard WJ 2007. CREB/ATF-dependent T cell receptor induced Foxp3 gene expression: A role for DNA methylation. *J. Exp. Med 204:* 1543 -1551.
54. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev.Immunol. 27*: 485-517.
55. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Gause WC 2007. Alternatively activated macrophages in the helminth infections. *Curr. Opin. Immunol. 19:* 448-453
56. Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 52*: 575-580.

57. Leid RW, McConnel LA,1983. PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode, *Taenia taeniformis. Prostaglandins Leukot Med 11:* 317-323.
58. Lino Junior RS, Ribeiro PM, Antonelli EJ, Faleiros AC, Terra SA, Reis MA, and Teixeira VPA 2002. Características evolutivas do Cysticercus cellulosae no encéfalo e no coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical . 35:* 617-622.
59. Liu Z, Liu Q, Pesce J Anthony RM, Lamb E, Whitmire J, Hamed H, Morimoto M, Urban JF, Gause WC 2004. Requiriments for the development of IL-4 producing T cells during intestinal nematode infections: what it takes to make a Th2 cell in vivo. *Immunol rev 201:* 57-74.
60. Loos-Frank B, Zeyhle E 1982. The intestinal helminthes of red fox and some other carnivores in southwest Germany. *Z Parasitenkd 67*: 99-113.
61. Luis IT, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C 1988.Shift from an early protective Th-1 type immune response to late permissive Th-2 type response in murine cysticercosis. *J.Parasitol. 84*:74–81.
62. Machado RC, Marcari EL, Cristante SFV, Carareto CMA 1999. Giardiasis and helminthiasis in children of both public and private day-care centers and junior and high schools in the city of Mirassol, São Paulo State, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop 32:* 697-704.
63. Maglione PJ, Chan J 2009. How B cells Shape The Immune Response against *Mycobacterium tuberculosis. Eur J Immunol.39:* 676-686.
64. Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Célerier P 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS 12*: 1551-1566.
65. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Meera N, Taylor MD, Allen JE 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Reviews 201:* 89-116.
66. Mantovani A, Sica A, Locati M 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity 23*: 344-346.
67. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A 2002: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol 23:* 549-555.

68. Martinez FO, Helming L, Gordon S 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol 27:* 451-483.

69. McSorley HJ, Harcus YM, Murray J, Taylor MD, and Maizels RM 2008. Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi. *J Immunol 181:* 6456-6466.

70. Min B et al 2004. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med 200:* 507-517

71. Miura H, Itoh Y, Kozuka T 2000. A case of subcutaneous cysticercosis (Cysticercus cellulosae cútis). *J. Am. Acad. Dermatol 43:* 538-540.

72. Mosmann TR & Sad S 1986.The expanding universe of T cell subsets: Th1,Th2 and more. *Immunol Today 17(3)*: 142-156.

73. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gierdlin MA, Coffman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol 136(7):* 2348-2357

74. Mosser DM, Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol 8*: 958-969

75. Nascimento E 1991. Teníase e cisticercose. In Neves DP, *Parasitologia humana 8:* 230-242

76. Oliveira MAP, Santiago CH., Lisboa RC., Ceravollo PI., Trinchieri G, Gazinelli TR., Vieira QL. 2000. *Leishmania* sp: Comparative Study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in Their Ability to Initialize IL-12 and IFN-g Synthesis. *Exp Parasitol* 95:96-105.

77. Oliveira MAP, Tadokoro EC., Lima MCAG, Mosca, T., Vieira QL, Leenen, JMP, Abrahamsohn AI 2005. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levelof IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania. Microbes and Infection 7:* .213-223.

78. Padilla A, Govezensky T, Sciutto E, Jimenez-Garcia LF, Gonsebatt ME, Ramirez P, and Larralde C 2001. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. *J Parasitol 87:* 591-599.

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

80. Pfeiffer F, Kuschfeldt S, Stoye M 1997. Helminth fauna in red fox (*Vulpes Vulpes* LINNE 1758 ) in south Sachsen-Anhalt – 1. *Dtsch Tierarztl Wochenschr 104*: 445-448
81. Pittela JEH 1997. Neurocysticercosis. *Brain Pathology* 4: 681-693.
82. Prasad KN, Prasad A, Verma A, Singh AK 2008. Human cysticercosis and Indian scenario: a review. *J. Biosci 33:* 571-582.
83. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanhan G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJM, De Baetselier P, Ghassabeh GH 2005. Macrophage galactose – type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasite infections and alergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol. 77:* 321-327.
84. Rameshwar P., Gascon P 1995. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood 15 86(2):* 482-90.
85. Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowits RAB 1998. Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol. 64:* 108-113
86. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM 2001. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun 69*: 4554-4560.
87. Rey L 1973. *Parasitologia*. Guanabara Koogan, São Paulo, 695.
88. Rey L 1991. *Parasitologia – parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. Guanabara Koogan *,* São Paulo,*:* 731.
89. Rey L 2002. *Bases da parasitologia Médica*, Guanabara Koogan, São Paulo, 199-214.
90. Reyes JL, Terrazas CA, Vera-Arias L, and Terrazas LI 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect Genet Evol*.
91. Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC 1997. Granuloma cyokines in murine cysticercosis. *Infect. Immun 65:* 2925-2931.

92. Robinson P, White AC, Lewis DE, Thornby J, David E, Weinstock J 2002. Sequential expression of the neuropeptídeos substance P and somatostatina in granulomas associated with murine cysticercosis. *Infect. Immun. 70:* 4534-4538.

93. Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, and Terrazas LI 2002. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol 168:* 3135-3139.

94. Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, David JR. Bojalil R, Satoskar Ar Terrazas LI 2002. Macrofhage migration factor inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps. Infect Immun 71*: 1247-1254.

95. Rodriguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, and Terrazas LI 2004. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite Taenia crassiceps. *Infect Immun 72:* 4552-4560.

96. Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, and Terrazas LI 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun 70:* 3656-3664.

97. Roitt I, Brostoff J, Male D 2003.Imunologia, Manole, Barueri, 65-83

98. Ryu SY, Jeong KS, Yoon WK., Park SJ, Kang BN, Kim SH, Park BK., Cho SW 2000. Somatostatin and substance P induced invivo by lipopolysaccharide and in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide or interferon-gamma have differential effects on murine cytokine production. *Neuroimmunomodulation 8*: 25–30.

99. Shevach EM 2009. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity 30*: 636-645.

100. Shimalov VV., Shimalov, VT 2003. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res 89*:.77-78

101. Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM 2002. Helper T cells regulate type-2 innate immunity *in vivo. Nature 420*: 825 -829.

102. Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, and Kuhn RE 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval Taenia crassiceps. *Parasite Immunol 22:* 297-305.

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

104. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, and Larralde C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps). *J Parasitol 84:* 74-81.

105. Toenjes SA, and Kuhn RE 2003. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. *Parasitol Res 89:* 407-413.

106. Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, and Kuhn RE 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval Taenia crassiceps is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology 118 ( Pt 6):* 623-633.

107. Turvey SE, DPhil BS, Broide DH 2009. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol:* 1-9.

108. Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF, Livramento AJ, Silva MV, Nakamura PM., Ferreira W 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia cracisseps*. *Am J Trop Med Hyg.57:* 354-357.

109. Vianna LG, Macêdo V, Costa JM 1991. Cisticercose Músculo-Cutânea visceral – Doença rara?. *Rev. Inst. Med. Trop. 32:* 129-136.

110. Vianna LG, Macêdo V, Costa JM, Mello P, Souza D 1986. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. *Rev. Soc.Bras.Med Trop 19:*149-156.

111. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol 8.* 523-532.

112. Vinaud MC 2007.*Vias do metabolismo energético e respiratório em cisticercos de Taenia crassiceps in vivo e seu estudo in vitro sob a ação de fármacos anti-helmínticos*.Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 92pp.

113. Vinaud MC, Lino Junior RS, Bezerra JCB 2007. Taenia crassiceps organic acids detected in cysticerci. *Exp Parasitol 116:* 335-339

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

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

# *APÊNDICE*

Tabela 2. Hemograma de camundongos C57BL/6 infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps* aos 07, 30, 60 e 90 dias após a infecção.

| **Série Vermelha** | **07 dias** | | **30 dias** | | **60 dias** | | **90 dias** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Controle** | **Infectado** | **Controle** | **Infectado** | **Controle** | **Infectado** | **Controle** | **Infectado** |
| Hemácias cel/µL | $7,68x10^6 \pm 1,55x10^6$ | $7,22x10^6 \pm 7,64x10^6$ | $7,27x10^6 \pm 6.,8x10^6$ | $7,05x10^6 \pm 6,48x10^6$ | $7,74x10^6 \pm 5,89x10^6$ | $7,62x10^6 \pm 2,30x\ 10^6$ | $7,46x10^6 \pm 5,71x10^6$ | $6,90x10^6 \pm 7,39x10^6$ |
| Hemoglobina g/dL | 14 ± 0 | 13 ±1,4 | 13 ± 0,9 | 13 ± 0,2 | 13 ± 0,9 | 13 ± 0 | 13 ± 1 | 12 ± 0,6 |
| Hematócrito (%) | 38,3 ± 1,4 | 35,8 ± 3,5 | 33,3 ± 2,3 | 32,3 ± 1,9 | 35,6 ± 1,8 | 35,1 ± 1,2 | 36,3 ± 3,2 | 33 ± 3,6 |
| VCM (fL) | 50 ± 0,9 | 49,3 ± 0,5 | 46,1 ± 0,7 | 45,6 ± 0,9 | 46 ± 3 | 46 ± 3,5 | 48,3 ± 0,6 | 48 ± 0 |
| HCM (pg) | 18 ± 0,4 | 17,8 ± 0,2 | 18,3 ± 0,5 | 18,5 ± 0,7 | 18,3 ± 0,4 | 18,5 ± 0,7 | 17,6 ± 0,6 | 18 ± 1 |
| CHCM (g/dL) | 35,8 ± 1,6 | 36,5±0,7 | 39,5 ± 0,2 | 40,5 ± 3,1 | 37 ± 0,2 | 36,8± 1,2 | 36,3 ± 1,5 | 37,6 ± 2,1 |
| **Série Branca** | | | | | | | | |
| Leucócitos totais (cels/µL) | $8,15x10^3 \pm 4,7\ x10^3$ | $7,36\ x\ 10^3 \pm 3,3\ x\ 10^3$** | $5,13x\ 10^3 \pm 1,0\ x\ 10^3$ | $5,3\ x\ 10^3 \pm 2,0\ x\ 10^3$ | $9,61x10^3 \pm 0,35x10^3$ | $10,3x10^3 \pm 0,3x10^3$ **/*** | $28,4x10^3 \pm 4,7x10^3$ | $8,8x10^3 \pm 2,1x10^3$ ** |
| Neutrófilos (cels/µL) | $1,83x10^3 \pm 1,55x10^3$ | $1,28x10^3 \pm 0,35x10^3$ | $1,03x10^3 \pm 1,08x10^3$ | $0,72x10^3 \pm 0,12x10^3$ | $1,5x10^3 \pm 0,1x10^3$ | $2,0x10^3 \pm 0,6x10^3$ | $1,1x10^3 \pm 0,6x10^3$ | $1,9x10^3 \pm 0,5x10^3$ |
| Linfócitos (cels/µL) | $5,51x10^3 \pm 2,29x10^3$ | $5,31x10^3 \pm 2,66x10^3$** | $4,16x10^3 \pm 1,13x10^3$ | $4x10^3 \pm 1,5x10^3$ | $7,3x10^3 \pm 0,4x10^3$ *** | $7,55x10^3 \pm 0,7x10^3$ ** | $8,06x10^3 \pm 4,2x10^3$ | $6,47x10^3 \pm 1,75x10^3$ |
| Monócitos (cels/µL) | $0,98x10^3 \pm 0,68x10^3$ | $0,73x10^3 \pm 0,37x10^3$ | $0,6x10^3 \pm 0x10^3$ | $0,46x10^3 \pm 0,28x10^3$ | $0,8x10^3 \pm 0,2x10^3$ | $0,8x10^3 \pm 0,4x10^3$ | $0,66x10^3 \pm 0,41x10^3$ | $0,43x10^3 \pm 0,30x10^3$ |
| Eosinófilos (cels/µL) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| Basófilos (cels/µL) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| **Plaquetas** cels/µL | 836 ± 370 | 847 ± 400 | 635 ± 304 | 872 ± 91 | 666 ± 7,07 | 6 61 ± 70,2 | 822 ± 136 | 1000 ± 259 |

- diferença significativa entre controle e infectado, **diferença significativa entre dias experimentais,*** diferença significativa entre as linhagens

Tabela 3. Hemograma de camundongos C57BL/6 KO - IFNγ infectados no subcutâneo com cisticercos de *Taenia crassiceps* por 07, 30, 60 dias após a infecção.

| **Série Vermelha** | **07 dias** | | **30 dias** | | 60 dias | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Controle** | **Infectado** | **Controle** | **Infectado** | **Controle** | **Infectado** |
| Hemácias cel/µL | $8,15x\ 10^6 \pm 8,81\ x10^6$ | $7,80\ x\ 10^6 \pm 7,05\ x\ 10^6$ | $5,76x\ 10^6 \pm 1,86\ x\ 10^6$ | $6,36\ x10^6 \pm 8,81\ x10^6$ | $6,03x10^6 \pm 9,17x10^6$ | $6,85x10^6 \pm 901x\ 10^6$ |
| Hemoglobina g/dL | 14 ± 0 | 14 ± 0,7 | 9,5 ± 1,2 | 11 ± 2,8 | 10 ± 2,3 | 12 ± 2,3 |
| Hematócrito (%) | 40 ± 3,8 | 37,5 ± 2,6 | 26,5 ± 9,2 | 28,3 ± 3,3 | 28,3 ± 4,7 | 32,3 ± 5,2 |
| VCM (fL) | 48,8 ± 0,2 | 48 ± 1,4 | 38,6 ± 12 | 44,8± 1,2 | 46,8 ± 0,7 | 47,3 ± 0,9 |
| HCM (pg) | 17,8 ± 2,6 | 18,2 ± 2,1 | 14,2 ± 1,2 | 16,7 ± 1,9 | 17 ± 1,4 | 16,7 ± 1,4 |
| CHCM (g/dL) | 36,5 ± 1 | 38 ± 4,2 | 30,5 ± 1,7 | 37,5 ± 5 | 36,8 ± 2,6 | 37,1 ± 3,1 |
| **Série Branca** | | | | | | |
| Leucócitos totais (cels/µL) | $6,83x10^3 \pm 1,22x10^3$ | $9\ x\ 10^3 \pm 2,6\ x\ 10^3$ | $7,85x10^3 \pm 6,43x10^3$ | $7,16x10^3 \pm 0,5x10^3$ | $5,83x10^3 \pm 1,8x10^3$ | $5,01x10^3 \pm 0,02x10^3$ *** |
| Neutrófilos (cels/µL) | $0,68x10^3 \pm 0,30x10^3$ | $2,56x10^3 \pm 1,41x10^3$ | $0,6x10^3 \pm 0,52x10^3$ | $1,44x10^3 \pm 1,26x10^3$ | $2,03x10^3 \pm 2,12x10^3$ * | $1,03x10^3 \pm 0,56x10^3$ * |
| Linfócitos (cels/µL) | $5,53x10^3 \pm 1,03x10^3$ | $4,52x10^3 \pm 0,49x10^3$ | $4,45x10^3 \pm 2,85x10^3$ | $4,35x10^3 \pm 1,48x10^3$ | $3,02x10^3 \pm 0,26x10^3$ *** | $3,47x10^3 \pm 0,47x10^3$ |
| Monócitos (cels/µL) | $0,62x10^3 \pm 0,40x10^3$ | $1,33x10^3 \pm 0,99x10^3$ | $2,77x10^3 \pm 3,06x10^3$ | $1,82x10^3 \pm 0,31x10^3$ | $0,75x10^3 \pm 0,12x10^3$ | $0,78x10^3 \pm 0,31x10^3$ |
| Eosinófilos (cels/µL) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| Basófilos (cels/µL) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| **Plaquetas** cels/µL | 949 ± 8,5 | 766 ± 220 | 305 ± 41 | 901 ± 178 | 1083 ± 945 | 1 212 ± 89 |

- diferença significativa entre controle e infectado, **diferença significativa entre dias experimentais,*** diferença
- significativa entre as linhagens

# *ANEXOS*

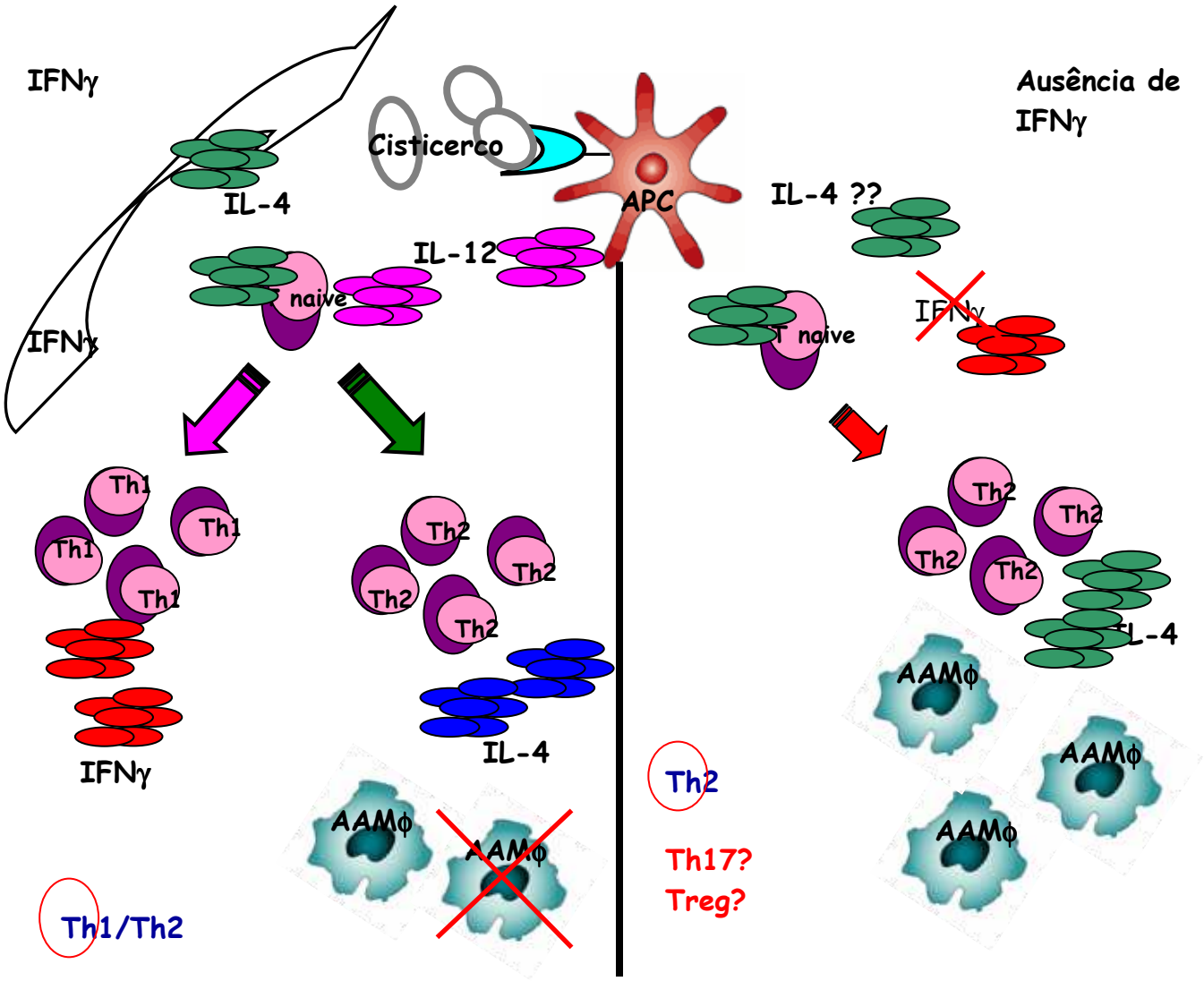


**Figura 24:** Esquema da resposta imune no modelo de cisticercose subcutânea experimental em camundongos C57BL/6 e C57BL/6 IFNγ -KO. APC: Célula Apresentadora de Antígeno, IFNγ: Interferon gamma, IL-4: Interleucina –4, IL-12: Interleucina –12, AAMϕ:Macrófago alternativamente ativado, Th1: T helper 1, Th2: T helper 2, T reg: T regulador, Th17: T helper 17.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo