

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

**VÂNIA BEATRIZ LOPES MOURA**

**O papel da arginase na cisticercose experimental por *Taenia crassiceps***

Orientador:

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Co-orientador:

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Dissertação de Mestrado

Goiânia, Goiás 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**

**VÂNIA BEATRIZ LOPES MOURA**

**O papel da arginase na cisticercose experimental por *Taenia crassiceps***

Orientador:

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Co-orientador:

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

**Dissertação submetida ao PPGMT/UFG como requisito total para a  
obtenção do Grau de Mestre na área de concentração de Imunologia**

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de  
apoio á pesquisa do estado de Goiás (FAPEG) processo número  
200710267000056.

Goiânia – GO 2010 –

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus que tornou possível que eu desbravasse esse caminho me guiando e me ensinando em todos os momentos.

A minha querida família aos meus pais Marta e Hélio, irmãos Valéria e Jonvaine, cunhados e sobrinhos Lorena, Adryenne, Aurílio Neto, Hélio Neto e Camile Vitória aos primos Rosângela, Rossana, Pérsio e Aurílio Júnior que vivenciou comigo cada momento sempre me alegrando e incentivando nesta caminhada.

Ao meu querido e amado esposo Paulo que esteve presente com sua grande sabedoria mostrando sua enorme paciência, dedicação e amor demonstrado em cada gesto. A cada dia me lembrando que a nossa grande união estava acima de qualquer má situação e mostrando a dimensão do nosso amor. Obrigado por você existir.

Aos meus filhos Priscila, Stéphanie e Paulo Júnior pelo silêncio precioso e pelas palavras confortantes de incentivo e pela compreensão da minha falta de atenção e pelas brincadeiras nas horas de descontração que me ensinou a importância de ter uma família unida e feliz em todos os momentos da vida. O meu amor é incondicional por vocês.

Queria agradecer também aos futuros genros Leonardo Soares e Rafael Wotkosky pela paciência demonstrada a cada pergunta sobre informática e por estarem presente nos momentos que eu estava ausente na vida das minhas filhas.

Ao meu orientador Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira por ter me orientado a cada técnica nova, pela paciência e compreensão em vários momentos sempre com uma palavra amiga e até mesmo de consolo. Mesmo nas horas de discordância se mostrou aberto ao diálogo sempre mostrando que devemos ser perseverantes em todos os momentos andando passo a passo comigo.

Ao meu co-orientador Dr. Ruy Lino de Souza Júnior por ter me dado a oportunidade de crescer se mostrando pronto, hábil, competente e paciente, se tornando um amigo ímpar na resolução de adversidades.

Aos professores da Patologia Liliana, Flávia, Ruy, Elisa e Raul Chavarria pelo incentivo e compreensão em todos os momentos dessa minha caminhada.

Aos meus colegas do laboratório de patologia experimental pelo companheirismo e aqueles que realmente se mostraram grandes amigos independente de qualquer situação, André, Hidelberto, Aline, Bruno, Diego e Juliana por ter sido amigos e conselheiros.

Aos meus colegas do laboratório de citocinas pelo companheirismo, amizade e pelas horas de diversão e pelas brincadeiras saudáveis nos momentos de descontração e pelos conselhos, Lucas, Clayson, Mayara, Lucilla, Walk, Bruno, Marcondes, Danillo e Renato.

Aos professores de outros departamentos pelo grande incentivo e motivação, Mara, Mirian, Fátima, Ana Paula, Mariane, Adriana, Adelaire, Christian, Marina e José Clecildo.

A todos os meus amigos de outros laboratórios pela boa convivência, amizade e aprendizagem, Simone, Erildo, Ludimilla, Regiane, Bruna, Keilla, Aline, Mirian, Juliana, Ana Claudia, Carolina Miguel, Carolina Aguiar, Neusa, Michelle, Eduardo, Adeliane e Mayara.

Aos meus colegas e funcionários da UFG pelo incentivo, Eunice, Marly, Iraci, Nair, Mônica, Hildene, Rosimary, Cristina e Solimar.

Aos meus colegas e funcionários da sublime pela amizade, presteza e palavras de motivação que tanto me ajudou, Raimundo (Lim), Gilda, Viviane, Cláudio, Antônia, Vany, Shirley e Graça.

Aos vigilantes pelo bom humor e educação, Tiago, Fábio e Américo.

Aos funcionários da secretaria Fernando, Cida, Almir e Divina, pela atenção e presteza em esclarecer tantas dúvidas e pelo auxílio na confecção e impressão de tantos documentos.

Aos funcionários da pós-graduação Zezinho e Kariny, pela educação em cada informação recebida e pela rapidez na informação de novos cursos e técnicas oferecidos dentro ou fora dessa instituição.

A tantos outros meu muito obrigado.

## **Lista de Abreviaturas**

- AAM $\phi$  – macrófagos alternativamente ativados
- APC – Células apresentadoras de antígenos
- C - celcius
- CCR5 – receptor para quimiocina 5
- CD – grupos de diferenciação (do inglês cluster differentiation)
- ConA - concanavalina A
- CM $\phi$  – macrófagos classicamente ativados
- d - dias
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- D.O – densidade óptica
- ELISA – enzima imunoenzimático
- Fizz-1 – membro da família da quitinase encontrada na zona de inflamação  
(found in inflammatory zone)
- HE – hematoxilina e eosina
- IFN $\gamma$  – interferon gama
- IgG – imunoglobulina G
- IL - interleucinas
- IL12p40 – interleucina 12 subunidade 40
- iNOS – óxido nítrico sintase induzível
- IP - intraperitoneal
- IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- LPS – lipopolissacarideo
- M - molar
- nm - nanômetro
- mMGL1 e 2 – lectinas do tipo C do tipo 1 e 2
- MHC – complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, major histocompatibility complex)
- MR – receptor de manose
- ng - nanograma

NO – óxido nítrico

ORF – original Fox

PBS – solução salina tamponada com fosfatos (do inglês phosphate buffer saline)

PD-L1 e PD-L2 – domínio de morte programada (do inglês, programmed death domain 1 and 2)

PGE2 – prostaglandina do tipo E

PMN – polimorfonucleares

SD – desvio padrão

SFB – soro bovino fetal

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

TCD4 $\gamma\delta$ <sup>+</sup> - células T CD4 do tipo gama delta

TCD4 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> - células T CD4 do tipo alfa beta

TGF- $\beta$  – fator transformador de crescimento beta

Th1 – Linfócito T auxiliares do tipo 1 ( do inglês, T *helper* 1)

Th2 – Linfócito T auxiliares do tipo 2 ( do inglês, T *helper* 2)

TREM-2 – receptor expressado em células mielóides ( do inglês, Triggering receptor expressed on myeloid cells)

UFG – Universidade Federal de Goiás

Ym-1 – lectina com afinidade para quitina (do inglês, molecule like chitinase type 1)

## Lista de Figuras

### Revisão da Literatura

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Ciclo Biológico da <i>Taenia crassiceps</i> ----- | 09 |
| Figura 2: Perfis diferenciados de Macrófagos -----          | 13 |

### Lista de Figuras do Artigo 1

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Características macroscópicas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> nos diferentes estágios de diferenciação retirados de camundongos BALB/c 60 dias após a infecção com 10 cisticercos em fase inicial. ----- | 38 |
| Figura 2: Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> recuperados de camundongos BALB/c em diferentes períodos após a infecção de acordo com estágio de diferenciação. -----  | 38 |
| Figura 3: Peso de camundongos BALB/c infectados com cisticercos de <i>T. crassiceps</i> em diferentes períodos após a infecção-----   | 39 |
| Figura 4: Análise de correlação entre o número total de cisticercos recuperados dos animais e peso-----   | 39 |
| Figura 5: Citocinas presentes no soro de camundongos infectados ou não com cisticercos de <i>T. crassiceps</i> . -----  | 40 |
| Figura 6: Número absoluto de leucócitos recuperados e porcentagem das diferentes populações celulares -----   | 41 |
| Figura 7: Porcentagem de células portadoras dos marcadores e Ly6G/C e ER-MP23 na cavidade peritoneal de camundongos infectados com <i>T. crassiceps</i> -----   | 41 |
| Figura 8: Produção de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos infectados com <i>T. crassiceps</i> . -----  | 42 |
| Figura 9: Atividade de arginase de células peritoneais de camundongos infectados com <i>T. crassiceps</i> . -----   | 42 |
| Figura 10: Deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados com <i>T. crassiceps</i> . -----  | 43 |

## Lista de Figuras do Artigo 2

Figura 1: Análise ponderal de camundongos infectados ou não com *T. crassiceps* e tratados com de nor-NOHA ou L-arginina.

-----68

Figura 2: Número de cisticercos recuperados da cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina.

-----69-

Figura 3: Porcentagem de células CD301+ na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina.

-----

70

Figura 4: Produção de óxido nítrico (A) e atividade de arginase (B) de células na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina.

-----  
71

Figura 5: Deposição de colágeno sobre o peritônio de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina.

-----72

Figura 6- Tratamento com anticorpo anti-CD301 não altera o curso da cisticercose experimental.

-----73

## **Lista de Figuras do anexo**

Figura 1 - Inibição da atividade de arginase pelo inibidor nor-NOHA *in vitro* em cisticercos e macrófagos residentes.-----77

Figura 2 - Inibição da atividade de arginase pelo inibidor nor-NOHA *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongos infectados.-----77

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| Agradecimentos-----   | i   |
| Lista de abreviaturas-----  | iii |
| Lista de figuras da revisão da literatura-----  | v   |
| Lista de figuras do artigo 1-----   | v   |
| Lista de figuras do artigo 2-----   | vi  |
| Lista de Figuras do anexo-----  | vii |
| Resumo da dissertação-----  | 1   |
| Abstract-----   | 2   |
| Revisão da Literatura-----  | 3   |
| A Teníase e a cisticercose-----   | 3   |
| Cisticercose humana-----  | 5   |
| O modelo experimental <i>Taenia crassiceps</i> -----  | 7   |
| Ciclo biológico da <i>Taenia crassiceps</i> -----   | 8   |
| A Resposta Imune aos Helmintos-----   | 10  |
| Os macrófagos na infecção parasitária-----  | 12  |
| Influência de glicoconjugados na resposta imune-----  | 14  |
| A resposta imune a <i>T. crassiceps</i> -----   | 15  |
| A enzima arginase-----  | 18  |
| Justificativa-----  | 20  |
| Objetivos-----  | 21  |
| Objetivos Gerais-----   | 21  |
| Objetivos Específicos-----  | 21  |
| Manuscrito 1 - O Aumento da deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados por cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> associa-se com aumento de IL-4, mas não com aumento de macrófagos alternativamente ativados. ----- | 23  |
| Resumo-----   | 24  |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| Introdução-----                   | 25 |
| Materiais e Métodos-----          | 28 |
| Resultados-----                   | 34 |
| Discussão-----                    | 44 |
| Referência Geral do artigo 1----- | 49 |

|  |    |
|--|----|
| Manuscrito 2 - Inibição da enzima arginase diminui a deposição de colágeno no sítio da infecção por <i>Taenia crassiceps</i> sem interferir com o desenvolvimento da doença. ----- | 58 |
|--|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| Introdução-----                   | 59 |
| Materiais e Métodos-----          | 61 |
| Resultados-----                   | 65 |
| Discussão-----                    | 74 |
| Anexo-----                        | 77 |
| Discussão da Dissertação-----     | 78 |
| Conclusões-----                   | 81 |
| Referência Geral do artigo 2----- | 82 |

### Resumo da dissertação

A infecção murina por cisticercos de *Taenia crassiceps* vem sendo utilizada como um modelo experimental para estudo da cisticercose humana e animal. Nesta infecção encontram-se parasitos presentes em um infiltrado inflamatório rico em macrófagos. Estes macrófagos podem ser divididos em alternativamente ativados (AAMØ), que expressam uma grande quantidade da enzima arginase ou classicamente ativados (CMØ,) que expressam uma grande quantidade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A arginase utiliza o substrato L-arginina para produção de ornitina, favorecendo a proliferação celular e a síntese de colágeno. A iNOS utiliza o mesmo substrato para síntese de óxido nítrico (NO) que é um gás microbicida responsável pelo controle dos cisticercos. Para observar se há uma associação entre a presença de macrófagos expressando arginase com aumento da susceptibilidade à infecção por *T. crassiceps*, camundongos BALB/c foram infectados IP com 10 cisticercos e acompanhados diariamente por 84 dias. Foi avaliado o número dos cisticercos, o perfil sistêmico de citocinas, o perfil dos macrófagos do infiltrado e a deposição de colágeno no peritônio ao longo da infecção. Adicionalmente, os camundongos infectados foram tratados com inibidor de arginase ou com L-arginina. A carga parasitária aumentou significativamente após o 30º dia, atingindo 1022 ( $\pm$ 230) cisticercos no final do período experimental. O interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sérico dos animais infectados foi superior ao dos controles no 28º dia após a infecção e a IL-4 no 42º dia. Os macrófagos foram predominantes durante todo período experimental e os polimorfonucleares (PMN) apresentaram um pico no 14º dia após a infecção, retornando aos valores normais no 42º dia. Células portando o marcador CD301 presente em AAMØ e com alta atividade da enzima arginase aumentaram nas duas primeiras semanas após a infecção mantendo-se alta por todo período experimental. A presença de colágeno no peritônio dos animais infectados diminuiu até 14º dia após a infecção, porém, nas fases mais tardias o colágeno aumentou tornando-se superior ao dos controles. O tratamento com o inibidor da arginase ou L-arginina não alterou o perfil da infecção, porém, o inibidor de arginase inibiu a deposição de colágeno no peritônio. Estes resultados sugerem que a enzima arginase não interfere no controle dos cisticercos durante a infecção experimental por

cisticercos de *T. crassiceps*, mas ela é importante na formação de fibrose característica da cisticercose.

Palavras chaves: *Taenia crassiceps*, cisticercose, macrófagos alternativamente ativado, colágeno.

## Abstract

### **The role of arginase on experimental cysticercosis induced by *Taenia crassiceps***

Murine infection by *Taenia crassiceps* cysticerci is used as an experimental model for human and animal cysticercosis. In this infection parasites can be found inside an inflammatory infiltrated enriched with macrophages. These macrophages can be divided in alternatively activated, that express high amount of the arginase enzyme and classically activated (CM $\emptyset$ ) that express high amount of induced nitric oxide sintase enzyme (iNOS). Arginase uses the substrate L-arginine to produce ornithine favoring the cellular proliferation and collagen synthesis. The iNOS uses the same substrate to synthesize nitric oxide (NO), which is a highly microbicide compound responsible for the cysticerci control. To observe if there is an association between macrophages expressing arginase and an increase of the susceptibility to *T. crassiceps*, BALB/c mice were infected IP with 10 cysticerci and followed up by 84 days. It was measured the number and stages of the cysticerci, profile of systemic cytokines, profile of the macrophages in inflamed tissue and collagen deposition over the peritoneum. Besides, infected mice were treated with arginase inhibitor or L-arginine and followed up by 56 days. The parasitic load was observed, which increased significantly after the 30th day. At the end of experimental period number of cysticerci was 1022 ( $\pm$ 230). The serum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) of infected animals was higher than controls at the 28th day after infection and IL-4 at the 42th day. Macrophages were the major cells observed at the infected site, and the polimorphonuclear cells (PMN) picked at the 14th day after the infection, returning to the normal values at the 42th day. Cells carrying the marker CD301, present on AAM $\emptyset$ , and high arginase activity increased in the early phase after infection. The presence of collagen in the peritoneum of infected animals decreased until 14th day after the infection, however, in the latest phases the collagen increases and become superior to the control. The treatment with the arginase inhibitor or L-arginine did not alter the profile of the infection; however the arginase inhibitor inhibited the deposition of collagen in the peritoneum. These results suggest that the enzyme arginase does not interfere with the control of the cysticerci during experimental infection with *T. crassiceps* cysticerci, but it is important for the formation of fibrosis in cysticercosis.

Keywords: *Taenia crassiceps*, cysticercosis, alternatively activated macrophages, collagen.

## Revisão da literatura

Helminto é um termo usado para um grupo similar de parasitos multicelulares que são distribuídos em três filos: os platelmintos (helmintos achatados), os nematodas (helmintos arredondados) e os acanthocephalans (helmintos com cabeça de espinho). Uma ampla variedade de espécies de helmintos, possuindo um ciclo de vida que pode ser monoxênico com transmissão de um hospedeiro definitivo para outro, ou heteroxênico, envolvendo distintos estádios de vida e diferentes espécies de hospedeiro. Em alguns estádios, os parasitos muitas vezes são capazes de migrar através de diferentes órgãos, sistemas e tecidos dentro do hospedeiro. Há uma grande diversidade de helmintos adultos que podem variar em tamanho de centenas de micra até dez metros de comprimento. Geralmente, os cestodas produzem ovos em proglotes que são dispersos no meio ambiente e que podem ser carregados por um vetor artrópode facilitando a propagação da infecção (Jackson 2008)

Parasitos helmintos afetam milhões de pessoas em todo mundo, sendo a principal causa de doenças infecciosas. A morbidade a estas doenças vem aumentando, o que afeta a susceptibilidade a outros agentes infecciosos e em alguns casos, leva o hospedeiro à morte. Todavia, o cuidado efetivo com a saúde e medidas de saneamento básico ajudam tanto na eliminação como evitam a re-infecção (Gause et al. 2003)

### A Teníase e a cisticercose

Os cestódeos *Taenia solium* e *Taenia saginata* são os agentes etiológicos da teníase humana. O gênero *Taenia* pertence à família *Taeniidae*, classe *Cestoidea* e ordem *Cyclophyllidea* (Rey, 1991). As respectivas formas larvais, *Cysticercus cellulosae* e *Cysticercus bovis*, causam a cisticercose. As tênias possuem dois hospedeiros durante o ciclo de vida, um definitivo e um intermediário. O homem é único hospedeiro definitivo de ambas as tênias, alojando a fase adulta do parasito no intestino delgado. Os cisticercos se desenvolvem nos hospedeiros intermediários, sendo observados mais comumente na musculatura, mas podem também estar presentes em outros locais, sendo que os cisticercos de *T. solium* desenvolvem nos suínos e os de *T. saginata* nos bovinos. (Acha & Szyfres, 1986; Rey, 1991).

Os conhecimentos acerca da cisticercose foram inicialmente datados da antiguidade, por Aristóteles. Até a metade do século XIX, as informações sobre esta

helminíase ficaram desconhecidas, até que pesquisadores alemães demonstraram que a larva de *Taenia solium* era a responsável por promover a doença tanto em animais quanto em seres humanos (Del Brutto & Sotelo 1988). Os cisticercos são liberados durante a digestão da carne e o escólex desenvolve-se sob ação da bile, fixando-se no intestino delgado do homem. As pessoas que preparam alimentos e provam a carne antes de cozinhar e indivíduos que fazem as refeições fora de casa estão mais sujeitos à teníase. Fatores econômicos, culturais (hábitos alimentares) e religiosos predis põem alguns grupos de indivíduos a um maior ou menor grau de susceptibilidade. Na culinária tradicional de muitas culturas há pratos que utilizam carne crua, como o quibe cru, que favorece a infecção humana. (Rey, 1991).

As tênias podem viver muitos anos no intestino delgado do homem, que adquire o patógeno ao ingerir carne contaminada crua ou mal cozida contendo cisticercos (Gemmell & Johnstone 1983). Do intestino do hospedeiro, elas liberam proglotes grávidas contendo os ovos juntamente com as fezes, que contaminam o ambiente. Quando os bovinos ou os suínos ingerem os ovos das tênias junto com o pasto ou a água, desenvolvem cisticercos em seus tecidos. Devido à alta viabilidade dos ovos no meio ambiente, o animal pode se infectar sem a necessidade de ingerir diretamente as fezes. Há fatores que auxiliam a dispersão dos ovos tais como: a contaminação fecal do solo, o transporte através do vento, aves, anelídeo e artrópode (moscas, besouros, traças, formigas, pulgas e ácaros (Gemmell & Johnstone 1983; Lawson, 1982; Gemmell & Lawson, 1982).

Os ovos de todas as tênias são sensíveis à dessecação e à temperatura elevada (Gemmell & Lawson, 1982; Gemmell, 1987), podendo permanecer viáveis na pastagem por períodos que variam de 4 até 12 meses (Huggins, 1989). Os ovos são resistentes ao tratamento convencional de esgotos (Gemmell & Johnstone 1983; Reiff, 1994), porém o tratamento da água como floculação, sedimentação e filtração são suficientes para eliminar os ovos (Reiff, 1994). Na utilização de fezes como fertilizantes, a maneira mais prática de inviabilizar os ovos de tênia seria pela elevação da temperatura através da compostação aeróbica, que pode atingir temperaturas maiores que 65° C por mais de 7 dias (Reiff, 1994). O calor mata os cisticercos, sendo que o *C. cellulosae* morre a temperaturas de 55°C, enquanto que o *C. bovis* morre a 50°C. A salga também torna os cisticercos inviáveis, sendo capaz de destruí-los quando presentes na carne de porco em 14 dias quando a mesma é cortada e submersa em salmoura a 25% (Bartels, 1971).

A aplicação de medidas para o controle da teníase/cisticercose depende das características epidemiológicas da enfermidade na região, incluindo condições econômicas, sociais e culturais. A estratégia fundamental consiste em interromper o ciclo evolutivo do parasita a fim de evitar a infecção nos animais e na população humana (Organização Panamericana de Saúde, 1994). As estratégias consistem fundamentalmente em: melhoramento das condições de saneamento do meio ambiente; tratamento de toda a população infectada; melhoramento da criação de animais (evitar o acesso de animais à fezes humanas); incremento na inspeção veterinária de carnes e derivados; evitar o abate e comércio de produtos clandestinos; educação em saúde enfatizando a adoção de hábitos de higiene (Gemmell & Johnstone 1983) (Organização Panamericana de Saúde, 1994; Reiff, 1994). Para países endêmicos, além das medidas citadas acima, o congelamento da carne também pode diminuir a transmissão da enfermidade (Sotelo *et al.* 1986)

A Organização Pan-americana (OPAS) e Mundial de Saúde (OMS) consideram os índices de 1% para teníase humana, 0,1%, para cisticercose humana e 5% para cisticercose animal como endêmicos, caracterizando a endemicidade desta doença na América Latina e ressaltando o importante problema de saúde pública da teníase e cisticercose. Cerca de 50 milhões de pessoas no mundo apresentam a cisticercose, incluindo 32 milhões na África, 11 milhões na Ásia e 3 milhões na América. Na América Latina, vários países são considerados endêmicos para a cisticercose, tais como: Argentina, Venezuela, México, Colômbia, Guatemala, Uruguai e Brasil (Flisser 1991, Nascimento 1991, Pedretti *et al.* 1999).

#### Cisticercose humana

A importância do complexo teníase/cisticercose para a saúde pública resulta do fato de que o homem, além de hospedeiro definitivo da tênia, pode se tornar hospedeiro intermediário e abrigar a fase larval, caracterizando a cisticercose humana (Acha & Szifres, 1986; Rey, 1991). Após um a três dias da ingestão de ovos, ocorre a liberação dos embriões no duodeno e jejuno. As larvas alcançam a circulação sanguínea e se fixam em diversos tecidos (Rey, 1992; Veronesi *et al.* (1991).

Devemos ressaltar a importância da cisticercose em diferentes processos patológicos humanos, os quais dependem da localização do parasita. Cisticercos em tecidos nobres, como o globo ocular e o sistema nervoso central (neurocisticercose),

provocam doenças mais graves que cisticercos em outras localizações, como a subcutânea, a muscular e a visceral, que são achados sem maior significado. Porém, a presença de cistos nessas últimas localizações poderia ser um indicador da presença de cistos nos tecidos mais nobres. (Sotello, *et al.*, 1988; Flisser, 1991; Nascimento, 1998; Pefretti, 1999)

A cisticercose é a enfermidade parasitária que afeta o sistema nervoso central com a maior freqüência (De Albuquerque & Galhardo 1995, Del Brutto & Sotelo 1988), sendo considerada a mais grave das infecções parasitárias do sistema nervoso humano (Couldwell & Apuzzo 1992; Flisser & Planoarte, 1991; Schenone *et al.*, 1982). A neurocisticercose acomete um grande número de pessoas e produz algumas vezes sintomatologia grave (Flisser 1991).

As freqüências de cisticercose no Brasil variam de 0,12% a 3,6%, sendo a localização mais freqüente o sistema nervoso central (Costa -Cruz *et al.* 1995). Segundo De Albuquerque e Galhardo (1995), a incidência da neurocisticercose tem sido considerada baixa no nordeste brasileiro, sendo mais freqüente nos estados do sul, sudeste e centro-oeste do país. Isso pode ser devido à falta de diagnóstico, visto que as manifestações são de difícil diagnóstico (De Albuquerque & Galhardo 1995; Chequer & Vieira, 1990; Trevisol-Bittencourt *et al.*, 1998; Vaz *et al.*, 1990). A cisticercose pode ser encontrada em vários estados brasileiros, dentre eles podemos citar Minas Gerais (Gobbi *et al.* 1980), com incidência de 2,4% de casos de cisticercose e destes 66% eram neurocisticercose. Clemente & Wernneck (1990) calculam que a incidência de neurocisticercose no Rio de Janeiro é de cerca de um caso por mês. No município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Chimelli *et al.* (1998) relataram uma prevalência de 67 casos/100.000 habitantes. Em Botucatu, no interior do Estado de São Paulo foram atendidos até 1990 oitenta e sete casos novos de NCC em moradores do município de 90.761 habitante, correspondendo à prevalência aproximada de 96:100.000 habitantes. No centro-oeste a prevalência soro epidemiológica foi de 4,14:100.000 habitantes enquanto a prevalência clínica foi de 1,86:100.000 habitantes, (Agapejev, 2003). Em catalão, Goiás, foram analisadas 354 amostras de habitantes testados pelo método de ELISA com o objetivo de detectar anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium*. A freqüência de anticorpos nas amostras de soro da população estudada foi de 11,3%, sendo que a porcentagem de soro positividade para cisticercose foi significativamente maior nos indivíduos que residiam em áreas sem sistema de esgoto ( $p < 0,0001$ ). (Oliveira *et al.*, 2006)

## O modelo experimental *Taenia crassiceps*

A *T. crassiceps* foi descrita no século XIX pelos pesquisadores Zeder & Rudolphi, que a descreveram como um representante da família *Taeniidae*, classe *Cestoidea* e ordem *Cyclophyllidae*. Os parasitos adultos têm tamanho entre 7-14 cm, corpo segmentado em proglotes hermafroditas, ausência de trato digestório e escólex com duas coroas de acúlios (32-36 acúleos por fileira). A forma larval, *Cysticercus longicollis* é caracterizada por um cisticercos de 4-5mm de diâmetro com escólex invaginado capaz de produzir inúmeros brotamentos na superfície de sua membrana (Freeman 1962, Maillard et al. 1998).

O cestóide *T. crassiceps* foi inicialmente identificado como parasito de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), sendo encontrado principalmente na Europa (Freeman 1962). O verme adulto foi detectado em áreas rurais da Grécia infectando raposas vermelhas, lobos, chacais e gatos selvagens (Papadopoulos et al. 1997). Na Alemanha foi relatada a presença de *T. crassiceps* em várias regiões parasitando raposas vermelhas, texugos, fuinhas e gatos (Ballek et al. 1992, Loos-Frank & Zeyhle 1982, Pfeiffer et al. 1997, Wessbecher et al. 1994). Raposas vermelhas infectadas também foram relatadas na Itália (Poglayen et al. 1985) e França (Petavy & Deblock 1980).

Os cisticercos de *T. crassiceps* podem acometer uma grande variedade de animais, sendo os mais comuns, roedores como ratos, ratazanas e coelhos. Porém, estes parasitos já foram identificados em marmotas, lêmures, cães e gatos domésticos (Brojer et al. 2002, Deblock & Petavy 1983, Dyer & Greve 1998, Freeman 1962). A presença de animais domésticos infectados com o helminto adulto de *T. crassiceps* aumenta a probabilidade da incidência de casos em humanos, indicando que o homem pode atuar como hospedeiro paratênico desenvolvendo cisticercose. A cisticercose humana por *T. crassiceps* pode ocorrer tanto em indivíduos imunocompetentes como no relato de uma jovem que desenvolveu cisticercose no olho direito após contato com um cão infectado (Arocker-Mettinger et al. 1992). Em indivíduos imunocomprometidos, a infecção e desenvolvimento de doença relacionada à *T. crassiceps*, parece estar ligada a imunossupressão, sendo encontradas em pacientes com AIDS e outras formas de imunossupressão. Como por exemplo, o relato de caso de uma mulher de 82 anos com história de linfoma de células B não Hodgkin em tratamento quimioterápico, que apresentou ao exame histopatológico cisticercos de *T. crassiceps* no subcutâneo e tecido

muscular (Heldwein et al. 2006). Animais domésticos, como os gatos, também podem atuar como hospedeiro paratênicos (Wunschmann et al. 2003), desenvolvendo cisticercos no sistema nervoso central e na região subcutânea.

Os cisticercos da *T. crassiceps* da cepa ORF (do inglês Original Fox) multiplicam-se rapidamente no peritônio de camundongos após a sua inoculação. Esta facilidade da manutenção deste parasito em modelo experimental estimula o seu uso em pesquisas científicas, principalmente aquelas relacionadas com as áreas bioquímicas e imunológicas (Vaz et al. 1997). Desta maneira, vários estudos da resposta imune em camundongos infectados por este helminto vêm sendo conduzidos, enfocando tanto a resposta nas primeiras semanas como em períodos tardios da infecção (Padilla et al. 2001).

#### Ciclo biológico da *Taenia crassiceps*

As formas adultas de *T. crassiceps* parasitam habitualmente o terço médio do intestino delgado de canídeos, especialmente raposas, coiotes e cães domésticos (Arocker-Mettinger et al. 1992, Freeman 1962, Shimalov & Shimalov 2003), os quais eliminam em suas fezes as proglotes grávidas, repletas de ovos, que são ingeridos por roedores, hospedeiros intermediários naturais (FIGURA 1). Os ovos eclodem no trato digestório dos roedores, liberando o embrião hexacanto (6 a 8  $\mu\text{m}$ ) que penetra pela mucosa e migra pelo organismo do hospedeiro pelos vasos linfáticos, até se alojarem em um determinado órgão ou cavidade. Normalmente, ele se aloja na região subcutânea, cavidades pleurais ou abdominais, região axilar, costelas, região inguinal e de modo menos freqüente na escápula (Padilla et al. 2001). Nestes locais, o parasito desenvolve-se em larva metacestóide ou cisticerco, que se multiplica por diversos brotamentos formados a partir de sua membrana externa. Esta forma larval pode ser detectada por volta de 12 dias após a ingestão dos ovos, podendo atingir o tamanho de 11 mm de comprimento. Os brotamentos se destacam do cisticerco na fase inicial, sendo que aos 30 dias de infecção esse número é bem grande. Apesar de apresentar o canal do escólex, muitos brotamentos não chegam a apresentar escólex, sendo incapazes de produzir parasitos adultos, mas capazes de produzir novos brotamentos. A capacidade reprodutiva dos brotamentos aumenta com o tempo de infecção. O hospedeiro definitivo ingere as larvas metacestóides e desenvolve o helminto adulto em 34 a 70 dias após a infecção. Os ovos podem ser encontrados nas fezes do hospedeiro definitivo a partir de

5 a 6 semanas após a infecção, a qual se mantém por até 9 meses neste hospedeiro, evoluindo para a cura espontânea. Em hospedeiros intermediários e paratênicos não foi relatada a cura espontânea (Freeman 1962, Maillard *et al.* 1998)

### Ciclo biológico da *Taenia crassiceps*

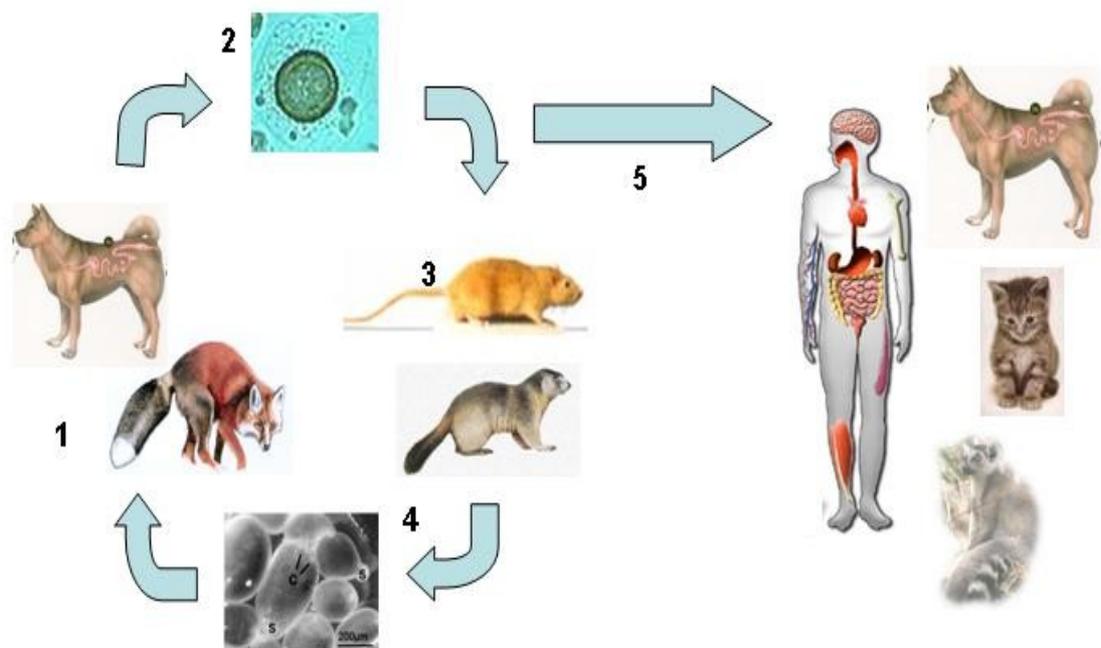


Figura 1: Ciclo biológico de *T. crassiceps*, com seus hospedeiros definitivos (1)

Figura 1: ciclo biológico de *T. crassiceps*, com seus hospedeiros definitivos (1) canídeos, (2) ovos, (3) hospedeiros intermediários - roedores, e (4) cisticercos, (5) hospedeiros paratênicos - mamíferos como o homem, lêmures e animais domésticos.

Adaptado de Freeman *et al.* 1962 e Vinaud *et al.* 2007.

## A resposta imune aos helmintos

A resposta imune do hospedeiro deve ser construída de modo que haja um controle do parasito, mas sem a destruição do próprio tecido e sem deixar de responder a outros patógenos (Gause et al. 2003). As moléculas e células envolvidas em ativar a resposta imune contra os helmintos permanecem enigmáticas. As pesquisas têm indicado a expansão das células T do tipo Th2 e células T regulatórias ( $T_{reg}$ ) como a resposta característica contra esses organismos (Maizels et al. 2009). As infecções helmínticas podem inibir os efeitos das reações inflamatórias excessivas em populações expostas a alguns agentes infecciosos, como malária e influenza e aumentar a susceptibilidade aos patógenos intracelulares, interferindo na ruptura e no controle imunológico gerando alergia e auto-imunidade (Jackson 2008, Loukas & Prociv 2001).

As células dendríticas (DC) ocupam uma posição de destaque na ativação da resposta imune e existe um grande interesse em descobrir como elas interagem com os helmintos. As células T auxiliares (Th) CD4+ não podem diretamente reconhecer antígenos, mas requerem que eles sejam processados e apresentados pelo complexo de histocompatibilidade maior (MHC) em moléculas de classe II presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC). Dentre elas podemos citar as DCs, macrófagos e células B apresentando antígenos no complexo de classe II. As DCs também têm grande habilidade em ativar células Th *naive* iniciando uma resposta imune adaptativa e induzindo a geração de células efetoras (Carvalho Lucas *et al.* 2008).

A resposta das DCs a produtos produzidos por patógenos microbianos é mediada por vários receptores da imunidade inata, destacando-se os receptores semelhantes ao Toll (TLRs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) como glicoproteínas e glicolípides que podem estar presente na superfície de helmintos. A ativação de uma DC inicia-se pela ligação dos antígenos a diferentes TLRs, os quais promovem a maturação das DC. Dentro desse novo estado de ativação, as DCs são capazes de secretar várias citocinas e quimiocinas, processar o antígeno, apresentar em moléculas de MHC e aumentar a expressão de moléculas co-estimulatória como CD80 e CD86. A maturação das DC tem sido considerada essencial para que elas se tornem hábeis em induzir respostas nas células T (Carvalho Lucas et al. 2008).

Antígenos de helmintos geralmente não são bons para induzir uma eficiente geração de DCs madura. Esta falha na indução dos sinais convencionais de ativação de DC pelos produtos helmínticos pode ser devido à falta de expressão dos ligantes dos

TLR associados com a indução de citocinas antiinflamatória como IL-10, conhecida por diminuir a resposta imune como também a lesão tecidual devido uma resposta uma Th1 eficiente. (Kane *et al.* 2004, Rigano *et al.* 2007).

Por analogia com a indução de uma resposta Th1, onde ocorre à produção de interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF), infecções helmínticas induzem uma resposta Th2, com alta produção de IL-4. Esta indução ocorre após a ligação dos PAMPs do parasito aos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) expressos em DC. Os PAMPs dos helmintos podem estimular uma ou por mais vias dos receptores da família TLRs, como também ligar a receptores do tipo lectina-C ou receptores de proteínas contendo domínios de oligomerização de união com nucleotídeos (NOD), ou receptores ativados por proteases (Jackson 2008). Foi relatado que substâncias presentes em ovos de *Schistosoma mansoni* (lacto-N-fucopentanose III) têm a capacidade de interagir com TLR4 ativando DC polarizando resposta para Th2. O liso-fosfatidilserina presente no *S. mansoni* pode interagir com TLR2 ativando DC favorecendo a polarização de células Treg (van Liempt *et al.* 2007). Produtos secretados/excretados por outros helmintos exercem efeitos imunomodulatórios sobre macrófagos e DC por mecanismos dependentes de TLR4 (Jackson 2008).

A diferenciação de célula Th em produtoras de IL-4 é um importante passo no desenvolvimento de uma resposta protetora efetiva no hospedeiro para a eliminação dos helmintos intestinais. A IL-4 pode diretamente mediar mecanismos de expulsão do verme e este mecanismo é implicado na amplificação das células Th2, produtoras de IL-4, IL-5 e IL-9 e IL-13. Estas citocinas estão envolvidos na ativação de células como mastócitos, eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (AAM0) e com o aumento da produção de IgE. É importante elucidar fatores que regulam o desenvolvimento de células Th2 e sua essência no desenvolvimento de uma imunidade protetora. Há evidências que o desenvolvimento de uma resposta Th2 em doenças infecciosas depende de sinais co-estimulatórios como B71 e B72 (Jankovic *et al.* 2001).

A resposta Th1 pode contribuir na expulsão de vermes viáveis através da produção de IFN $\gamma$ , que está envolvida na geração de macrófagos classicamente ativados (CM $\emptyset$ ) com produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio que destrói o tegumento do parasito e muda a qualidade da mucosa (Finkelman *et al.* 1997). O TNF pode agir diretamente sobre as células epiteliais do intestino ou também favorecer a resposta Th2 de modo acelerar a expulsão dos vermes (Artis *et al.* 1999).

A imunidade humoral também é relevante no controle dos helmintos. Os anticorpos, principalmente da subclasse IgE, ligados ao tegumento do parasito favorecem o reconhecimento pelos eosinófilos, mastócitos e basófilos através dos receptores de alta afinidade chamados FcεRI. Esta ligação de alta afinidade de células ao anticorpo provoca a destruição do parasito, mas também do tecido caracterizando a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Após a ligação dos anticorpos às células elas se desgranulam liberando grânulos tóxicos próximos ao tegumento do parasito provocando destruição do mesmo (Abbas, 2007).

### Macrófagos na infecção parasitária

Como citado anteriormente, citocinas do perfil Th1 e constituintes de patógenos são capazes de ativar macrófagos para o perfil de CMø. Uma das principais funções destas células é produzir reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio com alto poder microbicida. O óxido nítrico (NO) derivado dos CMø é citotóxico para larvas e certos metazoários como *Schistosoma* (Ahmed *et al.* 1997), mas em outras doenças helmínticas, como na infecção murina por *Trichinella spiralis*, esta molécula parece ser deletéria para o hospedeiro mediando lesões intestinais sem a expulsão do patógeno (Lawrence *et al.* 2000).

AAMø são ativados por citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-13, mas também por outras citocinas como IL-10, TGFβ além de glicocorticóides e constituintes de alguns patógenos (Gordon 2003). Os AAMφ favorecem o crescimento larval e podem ser identificados pelo aumento da expressão de vários marcadores como CD23, CCR5, Arginase-1, Fizz-1, Ym-1 e TREM-2 e receptores para carboidratos como o receptor para manose (MR) e para galactose (CD301). (Anthony *et al.* 2007, Raes *et al.* 2005, Reyes *et al.* 2009, Rodriguez-Sosa *et al.* 2002, Rodriguez-Sosa *et al.* 2006).

Uma das principais diferenças entre os CMφ e AAMφ é a alta expressão de NO sintase induzida (iNOS) nos CMφ e alta expressão de arginase nos AAMφ. Essas duas enzimas usam um substrato em comum, a L-arginina que é competitivamente regulada pelas citocinas do perfil Th1 ou Th2 (Modolell *et al.* 1995, Munder *et al.* 1998, Munder *et al.* 1999). Citocinas do tipo Th1 induzem ativação clássica de macrófagos com

indução da iNOS, que metaboliza a L-arginina gerando citrulina e NO. Citocinas do tipo Th2 resultam na ativação alternativa de macrófagos com expressão da arginase, a qual hidrolisa a L-arginina em ornitina, um aminoácido que é a principal fonte intracelular para síntese de poliaminas, gerando também a uréia (Goerdts & Orfanos 1999, Munder 2009, Munder *et al.* 1998). Poliaminas são importantes moléculas para a síntese de ácidos nucléicos e podem favorecer o crescimento do parasito. Vale ressaltar que carboidratos constituintes de glicoproteínas de helmintos são capazes de se ligarem nos receptores do tipo lectinas dos macrófagos e induzirem diretamente um aumento da expressão de arginase-1 e do marcador de AAMφ, o Ym1, independente das citocinas IL-4 e IL-13 (Atochina *et al.* 2008).

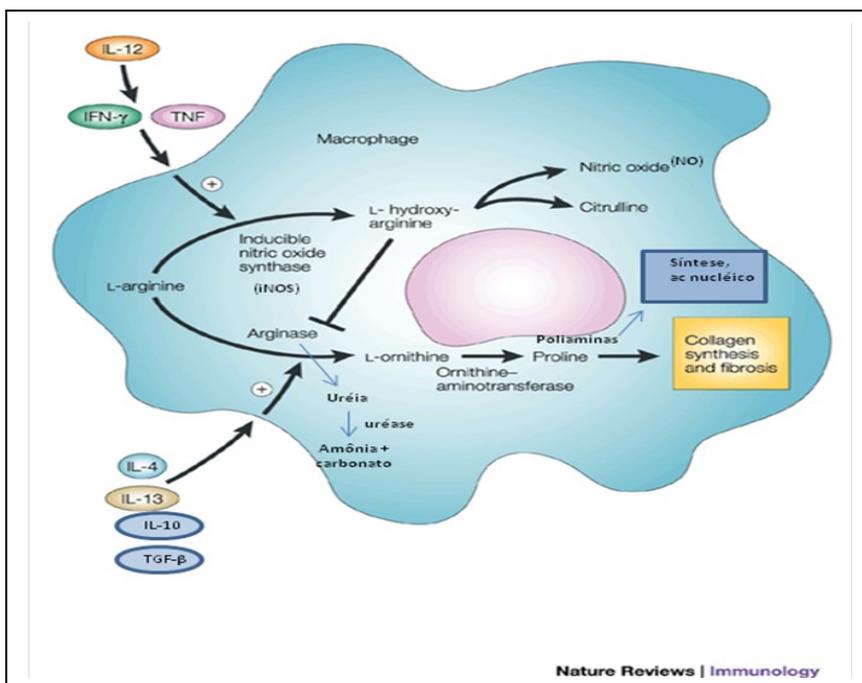


Figura 2: Perfis diferenciados de macrófagos

## Influência de glicoconjugados na resposta imune

Os helmintos possuem vários carboidratos na superfície que podem ser excretados/secretados e que têm um importante papel na regulação da resposta imune (Gomez-Garcia *et al.* 2006). Estes produtos podem ativar ou inibir as células do sistema imune inato e podem agir como mecanismos adjuvantes para aumentar a resposta Th2 (Atochina *et al.* 2001, Terrazas *et al.* 2001).

Carboidratos da superfície de patógenos podem se ligar a receptores do tipo lectinas na superfície dos macrófagos e células dendríticas. Lectinas que dependem de cálcio são chamadas de C-lectinas (Gazi & Martinez-Pomares 2009). As lectinas do tipo C do hospedeiro estão envolvidas em uma variedade de processos imune, entre eles, a captura e apresentação de antígenos, adesão celular, apoptose, polarização de células T (Loukas & Maizels 2000) processo homeostático, reconhecimento de patógenos, migração celular e sinalização intracelular (Gazi & Martinez-Pomares 2009). Os principais receptores tipo C-lectina que estão aumentados em AAM $\phi$  são os receptores para manose (MR) e os receptores para galactose, o CD301. O MR é capaz de reconhecer tanto ligantes endógenos quanto ligantes exógenos e têm um importante papel na resposta imune inata e na resposta adaptativa (Gazi & Martinez-Pomares 2009). Ele tem alta afinidade por manose e fucose e é importante para a ligação a diversos patógenos, como *Candida albicans* (Lee *et al.* 2003), *Cryptococcus neoformans* (Syme *et al.* 2002) ou *Mycobacterium tuberculosis* (Kang *et al.* 2005). O CD301 não tem uma especificidade bem definida, mas este se liga preferencialmente a galactose, N acetil-galactosamina e carboidratos Lewis X (van Vliet *et al.* 2008). Sua expressão foi descrita apenas em macrófagos e células dendríticas, mas não em monócitos, sendo que a presença de células portando este marcador está associada à inibição da resposta imune (van Vliet *et al.* 2008). O CD301 apresenta alta afinidade por glicoproteínas do parasito *S. mansoni* (van Vliet *et al.* 2005), por glicoproteínas associadas a tumores (Ichii *et al.* 2000) e por carboidratos da matriz extracelular (van Vliet *et al.* 2008). A neutralização deste receptor por anticorpos bloqueadores foi capaz de favorecer o aumento do número de células metastáticas em modelos experimentais de tumores, indicando um papel dos macrófagos CD301+ na ligação e contenção de células tumorais (Ichii *et al.* 2000).

A capacidade de sinalização destes receptores não é clara e provavelmente depende da participação de outros receptores para uma eficiente transdução de sinal,

porém, alguns ligantes do MR favorecem a produção de IL-10 e diminuição da produção de IL-12 (Gazi & Martinez-Pomares 2009).

Os patógenos também expressam lectinas do tipo C, porém, o seu papel biológico ainda é desconhecido. Sabe-se que as C-lectinas são particularmente abundantes na secreção de *T. canis* (Loukas & Maizels 2000, Loukas & Prociv 2001) e de *Ancylostoma* (Mulvenna *et al.* 2009). Foi sugerido que *T. canis* produz duas C-Lectinas (TES-32 and TES-70) com grande homologia com proteínas de mamíferos como o CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE) e MR. A TES-70 tem a habilidade de se unir a carboidratos de mamíferos inibindo células do hospedeiro tornando-as capazes de evadir da resposta imune do hospedeiro (Loukas & Maizels 2000). Essa evasão pode ser devido à capacidade das lectinas mascararem os carboidratos dos parasitos.

#### A resposta imune a *T. crassiceps*

Durante a infecção experimental por cisticercos de *T. crassiceps* observa-se que nos estágios iniciais da doença as células esplênicas estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA) produzem preferencialmente citocinas do perfil Th1 (Rodriguez-Sosa *et al.* 2002, Terrazas *et al.* 1998, Toenjes & Kuhn 2003, Toenjes *et al.* 1999). Este fato está associado a uma maior destruição do parasito e uma carga parasitária baixa (Alonso-Trujillo *et al.* 2007, Mooney *et al.* 2000, Rodriguez-Sosa *et al.* 2002, Terrazas *et al.* 1998). Em fases mais avançadas da doença, as citocinas encontradas após o estímulo de células esplênicas com a concanavalina A são do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (Rodriguez-Sosa *et al.* 2002, Terrazas *et al.* 1998, Toenjes & Kuhn 2003, Toenjes *et al.* 1999). Estas citocinas são associadas à modulação da resposta inflamatória (Conti *et al.* 2003, Robinson *et al.* 1997) que pode ser devida a presença de vários linfócitos B e T no local da infecção estimulado pelos antígenos do parasito e pela inibição da produção do IFN $\gamma$  (Padilla *et al.* 2001, Toenjes *et al.* 1999). Este resultado é decorrente da combinação da resposta imune às larvas com os produtos imunoregulatórios liberados pelos cisticercos quando estimulados com ConA e antígenos do parasito (Toenjes *et al.* 1999).

Como citado anteriormente, a resistência a helmintos é dependente de uma resposta Th2 (Gause *et al.* 2003, Locksley 1994, Terrazas 2008), entretanto, esta resposta Th2 está associada a um aumento na susceptibilidade de camundongos infectados com helmintos localizados em tecidos fora do intestino (Alonso-Trujillo *et al.* 2007, Rodriguez-Sosa *et al.* 2002). No caso da cisticercose por *T. crassiceps*, observa-se que a resistência é dependente de uma resposta Th1, pois animais desprovidos do gene de STAT4, os quais não são capazes de gerar uma resposta Th1 eficiente, apresentaram uma maior dificuldade em controlar o parasito. Por outro lado, animais desprovidos do gene de STAT6, os quais não são capazes de gerar uma resposta Th2 eficiente, são mais resistentes à infecção (Alonso-Trujillo *et al.* 2007, Rodriguez-Sosa *et al.* 2002, Rodriguez-Sosa *et al.* 2004). O tratamento dos animais infectados com IFN $\gamma$  ou anticorpos anti-IL-10 reduz o número de parasitas, ao contrário, o tratamento com IL-10 ou anticorpos anti-IFN $\gamma$  mostrou uma exacerbação da infecção (Terrazas *et al.* 1999). Uma eficiente resposta Th1 com grande produção de IFN $\gamma$  é importante para ativar a produção de NO, o que contribui para morte de vários patógenos intracelulares (Gazzinelli *et al.* 1998, Gordon 2003) e cisticercos de *T. crassiceps* (Alonso-Trujillo *et al.* 2007).

Os macrófagos provenientes de infecções agudas produzem altos níveis de IL-12 e NO após o estímulo com LPS e têm a habilidade de estimular a resposta proliferativa de células T (Rodriguez-Sosa *et al.* 2004). No decorrer da infecção, estas células podem tornar-se alteradas devido à exposição crônica aos parasitos e aos seus produtos, transformando-se em AAM $\phi$ , com atividade supressora, baixo potencial pró-inflamatório, sendo responsáveis em desligar respostas inflamatórias perigosa ao hospedeiro (Terrazas 2008).

Alonso-Trujillo *et al.* 2007, investigando o papel do NO na cisticercose por *T. crassiceps* mostrou que o bloqueio *in vivo* da enzima iNOS dos CM $\phi$  torna os camundongos altamente susceptível a cisticercose experimental.

Para melhorar a sobrevivência no hospedeiro, o cisticerco possui diversos mecanismos que modulam a resposta imune e inflamatória. A superfície do parasito é recoberta por uma camada de polissacarídeo que dificulta a ativação do complemento na parede do cisto (White 2000). A ação da via clássica do complemento também é inibida pela paramiosina presente no parasito (Laclette *et al.* 1990). Fatores secretados pelo cisticerco induzem a produção de prostaglandinas e de proteínas de baixo peso molecular que diminuem a inflamação e alteram a produção de citocinas pelos linfócitos

T auxiliares (Arechavaleta *et al.* 1998). O cisticerco secreta proteases que podem degradar IL-2 e imunoglobulinas além de possuírem antígenos que induzem apoptose de linfócitos TCD4+ e CD19+ (Lopez-Briones *et al.* 2003, White 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que fatores solúveis obtidos dos parasitos são capazes de modular negativamente ou positivamente a resposta imune do hospedeiro. A maior parte dos fatores solúveis obtidos de macerado dos cisticercos é composta de carboidratos (Gomez-Garcia *et al.* 2006). Estes carboidratos aparentemente são capazes de induzir:

a) a migração de células mielóides supressoras (F4/80+Gr1+) para o sítio da infecção, as quais modulam a proliferação linfocitária dependente de contato celular (Gomez-Garcia *et al.* 2006);

b) estimulação da produção de IFN $\gamma$  por células esplênicas ou peritoneais, dependente da ligação a receptores semelhantes ao Toll-4 (TLR-4) (Dissanayake & Shahin 2007, Dissanayake *et al.* 2005);

c) estimulação da produção de IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  de maneira independente de ligação a TLR4 (Gomez-Garcia *et al.* 2006);

d) indução da expressão de marcadores de macrófagos alternativamente ativados (Gomez-Garcia *et al.* 2006).

Esses produtos liberados pelo parasito têm a capacidade de modular a resposta imune, através do contato desse antígeno com linfócitos T naive e células acessórias tornando-as hábeis na produção inicial de IL-4, o que promove a polarização para a resposta Th2 permissiva (Rodriguez-Sosa *et al.* 2002).

## A enzima arginase

A enzima arginase hidrolisa a reação da L-arginina para L-ornitina e uréia. Existem duas isoformas da enzima em mamíferos, a arginase I, que é uma enzima citosólica expressa principalmente no fígado, mas também encontrada em células de origem mielóides (Munder 2009). A arginase II é mitocondrial, expressa em diversos tecidos, como rim, próstata, intestino delgado e glândula mamária (Munder 2009).

No fígado, a principal função da arginase é a desintoxicação pela eliminação da amônia como parte do ciclo da uréia, porém, em outros tecidos a arginase participa de outras funções. A L-ornitina produto da arginase pode ser descarboxilada para formar poliaminas, as quais são importantes para a síntese de ácidos nucleicos e proliferação celular. A ornitina também pode sofrer a ação da ornitina aminotransferase para dar origem à prolina, um importante aminoácido para síntese de colágeno.

No sistema imune, a arginase I é expressa principalmente em AAM $\phi$ , a qual é induzida pelas citocinas IL-4 e IL-13 (Gordon 2003). Como a arginase e a iNOS utilizam o mesmo substrato, a L-arginina, a presença da arginase em AAM $\phi$  está associada à diminuição da atividade microbicida. Além disto, devido ao favorecimento da síntese de prolina, a presença de AAM $\phi$  tem sido implicada em processos fibróticos (Wilson & Wynn, 2009).

A arginase também é encontrada em fibroblastos, onde sua expressão foi descrita como induzida por IL-4 e IL-13 (Lindemann & Racke 2003), porém outros autores sugerem que a arginase de fibroblastos não sofre alterações após o tratamento com citocinas do perfil Th2 (Thompson *et al.* 2008). As isoformas de arginase presente nos fibroblastos variam entre as espécies, sendo que fibroblastos humanos expressam principalmente a arginase II e em roedores a arginase I (Warnken *et al.* 2010).

Além de ser expressa nas células do sistema imune, patógenos também são capazes de expressar arginase, a qual pode estar relacionada a um mecanismo de escape, pois esta enzima poderia depletar a L-arginina do meio e diminuir a síntese de NO, favorecendo o crescimento do patógeno (Fitzpatrick *et al.* 2009).

Desde que ambas as isoformas de arginase são intracelulares, a utilização deste aminoácido pela enzima é dependente do seu transporte pela membrana celular. O transporte de aminoácidos catiônicos em macrófagos murinos é feito por duas enzimas. A CAT-1 é expressa constitutivamente e a CAT-2 é induzida tanto pela ativação

clássica de macrófagos (IFN $\gamma$ ) quanto pela ativação alternativa (IL-4 e IL-10) (Louis *et al.* 1999, Yeramian *et al.* 2006). Animais deficientes em CAT-2 são mais susceptíveis à infecção por *Toxoplasma gondii* devido a uma menor disponibilidade da arginina intracelular para produção de NO (Thompson *et al.* 2008). Porém, a ausência de CAT-2 não altera a implantação de ovos de *S. mansoni*, mas aumenta a fibrose e a atividade da arginase de fibroblastos e de macrófagos (Thompson *et al.* 2008), sugerindo que este transportador é importante para as duas vias tanto na captação de arginina para a síntese de NO, como também está relacionado com inibição da utilização da L-arginina pela arginase.

## **Justificativa**

Devido à importância da cisticercose humana e animal no Brasil a utilização de modelos experimentais favorece a compreensão da biologia do parasito e os processos imunopatológicos da doença. Assim, ao estudar o papel de algumas células como os AAMo, os quais participam do processo infeccioso e da formação de fibrose no tecido, poderá permitir a elaboração de estratégias para um melhor controle do processo patológico desencadeado também por outras infecções que causam fibrose.

## Objetivos

### Objetivos Gerais

Relacionar o aparecimento de macrófagos alternativamente ativados (AAMo) e a atividade da enzima arginase com a resistência ou susceptibilidade à infecção experimental por *T. crassiceps* e a deposição de colágeno induzida pela presença do parasito.

### Objetivos Específicos

1 - Quantificar dos cisticercos segundo suas características macroscópicas presentes na cavidade peritoneal durante a infecção experimental com *T. crassiceps*

2 - Quantificar as citocinas IL-12p40, IFN $\gamma$  e IL-4 no soro de camundongos durante a cisticercose experimental

3- Avaliar e caracterizar o perfil das células inflamatórias presente no lavado peritoneal no decorrer da infecção experimental com *T. crassiceps*.

4- Quantificar a deposição do colágeno no decorrer da infecção experimental com *T. crassiceps*.

5- Avaliar o efeito da inibição da arginase ou suplementação com L-arginina no desenvolvimento da infecção experimental com *T. crassiceps*.

## **Manuscrito 1**

Segundo as normas da Revista do Instituto Oswaldo Cruz, exceto os gráficos e legendas que foram adicionados após os resultados para facilitar a leitura da dissertação.

**Running Title:** Colágeno e macrófagos na cisticercose.

**Título:** O aumento da deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados por cisticercos de *Taenia crassiceps* associa-se com aumento de IL-4, mas não com o aumento de macrófagos alternativamente ativados.

**Vânia Beatriz Lopes Moura, Lucas Ferreira Batista, Ruy de Souza Lino Junior, Milton Adriano Pelli de Oliveira.**

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

Autor para correspondência: Milton Adriano Pelli de Oliveira: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil. FAX: (55) 62 35211839, Phone (55) 62 32096126. E-mail: mapoliv@usp.br

**Palavras Chaves:** *Taenia crassiceps*, cisticercose, macrófago alternativamente ativado, colágeno

Suporte Financeiro: FAPEG, CNPq, CAPES, FUNAPE.

## Resumo

A cisticercose é causada pela fase larvária de helmintos da família Taeniidae e o modelo murino para esta enfermidade é a infecção por larvas de *T. crassiceps*. Cisticercos de *T. crassiceps* proliferam por brotamentos na cavidade peritoneal de camundongos e são controlados por um mecanismo dependente de macrófagos ativado por interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Para estudar as alterações no perfil de ativação de macrófagos durante a infecção por *T. crassiceps*, camundongos BALB/c foram injetados com 10 cisticercos na cavidade peritoneal e acompanhados por 84 dias. O número de cisticercos aumentou semanalmente, atingindo em média 1022 ( $\pm$ 230) parasitos no final do experimento. A detecção da quantidade significativa de IFN $\gamma$  no soro dos animais infectados no 28º dia contrasta com a detecção aumentada da IL-4 após o 42º dia da infecção. Além disso, observamos que os macrófagos alternativamente ativado (AAMo) começaram a aumentar em número já nas primeiras semanas da infecção, como demonstrado pelo aumento da atividade da enzima arginase (sétimo dia após a infecção) e da expressão de CD301 (14º dia). A deposição de colágeno nos tecidos da cavidade peritoneal mostrou-se significativamente aumentada a partir do 56º dia após a infecção. Os resultados indicam que cisticercos de *T. crassiceps* induzem uma geração rápida de macrófagos alternativamente ativado, mas o aumento da deposição de colágeno só é observado após aumento da produção de IL-4.

## Introdução

A teníase e a cisticercose são doenças endêmicas em diversos países do mundo e são causadas, respectivamente, pelas fases adultas e larvárias dos helmintos da família Taeniidae. Na América Latina, vários países são considerados endêmicos para a cisticercose, tais como: Argentina, Venezuela, México, Colômbia, Guatemala, Uruguai e Brasil (Flisser 1991, Nascimento 1991, Pedretti *et al.* 1999).

O cestóide *T. crassiceps* foi inicialmente identificado como parasito de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), tendo roedores como hospedeiro intermediário no ciclo silvestre (Freeman 1962). Os cisticercos da cepa ORF deste parasito é incapaz de se transformar em verme adulto, pois não apresenta escólex, prolifera-se por brotamentos na cavidade peritoneal de camundongos e tem sido descrita como um importante modelo experimental da cisticercose (Vaz *et al.* 1997). O controle da proliferação destes cisticercos em camundongos é dependente da ativação de uma resposta Th1, caracterizada pela grande produção de IFN $\gamma$  que ativa macrófagos pela via clássica (Terrazas 2008). Macrófagos classicamente ativados (CM $\emptyset$ ) expressam uma maior quantidade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que utiliza a L-arginina para produção de óxido nítrico (NO) e citrulina (Martinez *et al.* 2009). O NO produzido por estas células é uma importante molécula microbicida que promove a morte de diversos patógenos, incluindo a *T. crassiceps* (Alonso-Trujillo *et al.* 2007). Alternativamente, os macrófagos podem ser ativados por citocinas do perfil Th2, como a IL-4 e IL-13, sendo denominados de macrófagos alternativamente ativados (AAM $\emptyset$ ). Estes macrófagos caracterizam-se por apresentarem um aumento na expressão da enzima arginase, a qual metaboliza a L-arginina para ornitina e uréia. A ornitina é um substrato para formação de poliaminas ou prolina, sendo a primeira importante para síntese de ácidos nucleicos e a segunda importante para síntese de colágeno (Anthony *et al.* 2007, Edwards *et al.* 2006, Martinez *et al.* 2009).

Embora as helmintíases sejam causadas por um grande número de organismos extremamente heterogêneos, aceita-se que a resposta imune a estes patógenos seja dominada por um perfil Th2 (Anthony *et al.* 2007). A capacidade de helmintos induzirem a geração do perfil Th2 está associada à presença de glicoproteínas ou glicolípides que ativam células dendríticas a induzirem a geração de linfócitos Th2 ou T reguladora (Harn *et al.* 2009).

Inicialmente, a geração de AAMø foi associada a uma prévia ativação dos macrófagos por citocinas Th2, sugerindo que uma resposta Th2 deve ser previamente gerada para que apareçam os AAMø (Martinez et al. 2009, Munder 2009, Stempin et al.). Entretanto, trabalhos mais recentes têm mostrado que grupos de carboidratos presentes em helmintos são capazes de diretamente ativarem a expressão de marcadores de AAMø (Atochina et al. 2008). Glicoconjugados de helmintos induzem um aumento da expressão de arginase-1 e da quitinase Ym-1 em macrófagos murinos mesmo na ausência de receptores para IL-4 e IL-13, (Atochina et al. 2008).

A ação de AAMø em uma infecção não é muito clara. Diversos trabalhos demonstram que eles são importantes células imunossupressoras por diminuírem a disponibilidade de L-arginina para os linfócitos T (Munder 2009, Pesce et al. 2009, Stempin et al.). Além disto, os produtos da enzima arginase favorecem a síntese de colágeno pelo aumento da disponibilidade ornitina e posteriormente de prolina, sugerindo que a presença de AAMø promove o aumento de fibrose e reparo tecidual (Munder 2009, Thompson et al. 2008). A presença de AAMø associados aumento de fibrose em infecções parasitárias crônicas têm sido amplamente difundidas (Marsland et al. 2008, Munder 2009, Thompson et al. 2008). Porém, este aumento de fibrose dependente da arginase específica de AAMø não foi confirmada no modelo de granuloma induzido por ovos de *Schistosoma mansoni* (Pesce et al. 2009).

Durante a infecção por cisticercos de *T. crassiceps*, foi observado que os macrófagos presentes no sítio da infecção possuem uma maior habilidade em produzir NO em uma fase mais inicial que macrófagos obtidos em fases mais tardias (Alonso-Trujillo et al. 2007, Mooney et al. 2000, Rodriguez-Sosa et al. 2002, Terrazas et al. 1998). Além disto, a resposta imune local é predominantemente Th1 nas fases iniciais e Th2 em fases mais tardias, sugerindo que os AAMø aparecem apenas nas fases mais tardias da infecção. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que glicanas obtidas de *T. crassiceps* são potentes indutoras de uma resposta Th2 e são capazes de induzir diretamente a geração de AAMø (Gomez-Garcia et al. 2006). Por outro lado, alguns carboidratos obtidos de *T. crassiceps* são capazes de induzir produção de IFN $\gamma$  e favorecer a geração de uma resposta Th1 (Dissanayake and Shahin 2007).

Como ainda não é claro como é a participação de AAMø na patogênese da cisticercose por *T. crassiceps* e como antígenos do parasito podem induzir uma ativação clássica ou alternativa dos macrófagos, investigou-se neste trabalho a cinética do aparecimento de AAMø, proliferação dos parasitos e deposição de colágeno no

peritônio de camundongos infectados intraperitonealmente com cisticercos do parasito para avaliar se existe uma associação entre a presença de AAMØ com o desenvolvimento dos parasitos e a formação de fibrose.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e infecção**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6 a 12 semanas do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram mantidos em gaiolas 20 X 30 cm, separados em grupos de 5 camundongos por gaiola. A luminosidade foi controlada por foto período de 12 horas. Os animais receberam água esterilizada e acidificada e ração esterilizada (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) fornecidos *ad libitum*.

O cisticercos de *T. crassiceps* pertencente à cepa ORF foi mantido por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade de acordo com Vaz et al (1997). Os animais foram infectados ou não com 10 cisticercos de *T. crassiceps* viáveis na fase inicial.

Após diferentes períodos (7, 14, 21, 28, 42, 56 e 84 dias) os 35 animais foram eutanasiados por decapitação para obtenção do sangue. As células e os cisticercos da cavidade peritoneal foram obtidos por lavagem peritoneal com solução salina tamponada (PBS). Os animais do grupo controle foram injetados com PBS. Os procedimentos deste projeto foram avaliados e aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás sob o protocolo 030/2008.

### **Pesagens dos animais**

Os animais do grupo infectado e controle foram pesados semanalmente em balança eletrônica de precisão (Bioprecisa BS3000A, série 09245) com precisão 0,1g.

### **Obtenção e quantificações dos cisticercos**

Após a eutanásia dos camundongos, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS estéril e a suspensão obtida colocada em tubos de polipropileno de 15 ml. A suspensão contendo células e cisticercos ficaram em repouso por 2 min para

sedimentação dos cisticercos e coleta do sobrenadante contendo as células. Os cisticercos foram separados e diferenciados segundo (Vinaud et al. 2008).

#### Análises das células do lavado peritoneal

O lavado peritoneal contendo as células foi centrifugado a 300x g, durante 10 minutos a uma temperatura de 10°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi desprezado e o sedimento foi ressuscitado com 1 ml de PBS. Para quantificação das células foi realizada uma diluição de 1:10 em azul de tripan e contagem em hematocítmetro. A concentração final de células ajustada para  $2 \times 10^6$ /mL em PBS. Uma quantidade de  $2 \times 10^5$  células foi centrifugada em citocentrífuga (FANEM) para se obter as amostras para confecção das lâminas para contagem diferencial das células. Essas lâminas foram fixadas com metanol, e coradas pela panótico (NEWPROV, Pinhais, PR, Brazil) e montadas com entellan (MERK).

Todas as lâminas foram analisadas sob microscopia de luz (objetiva de 100 X). Foram contadas 1000 células totais, diferenciando polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos em cada lâmina para determinar o perfil do infiltrado inflamatório durante a infecção.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação da IL-12p40, IFN $\gamma$  do perfil Th1 e IL-4 do perfil Th2.

Para os ensaios de ELISA de captura foram utilizados os anticorpos monoclonais produzidos a partir de hibridomas presentes no Laboratório de Citocinas da UFG. Os anticorpos de captura utilizados foram respectivamente: C17.8 para IL-12p40, XMG 1.2 para IFN $\gamma$  e 11B11 para IL-4. Estes anticorpos foram utilizados a 5  $\mu$ g/mL (IL-12 e IFN  $\gamma$ ) ou 10 $\mu$ g/mL (IL-4) em PBS, dispostos no volume de 80  $\mu$ L, nos poços das placas de ELISA (CORNING, NY, EUA) que foram mantidas à 4 °C por 24 h. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo 0,04% de Tween 20 (PBS-Tween) e incubadas com solução de bloqueio soro bovino fetal (SBF) a 3 % em PBS, 200  $\mu$ L/poço por 1 h a 37 °C. As placas lavadas novamente em PBS-tween 20 e foram adicionados 80  $\mu$ L dos soros equivalente a cada animal. Para as curvas padrões, foram adicionadas as citocinas recombinantes IL-12p40, IFN $\gamma$ , IL-4 murinas (R&D

SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, EUA), ou em diluições sucessivas a 1:2 em meio RPMI completo, na concentração inicial de 10 ng/mL. As placas foram mantidas a 4 °C por 24 h, sendo em seguida, lavadas com PBS-tween. Os anticorpos monoclonais biotinizados para detecção foram utilizados a 5µg/mL em solução de bloqueio sendo o anticorpo C15.6 para IL-12p40, ASN18 para IFN $\gamma$  e BVD6 para IL-4. Após 2 h em estufa a T.A., as placas foram lavadas com PBS-tween e adicionou-se 80 µL de estreptoavidina-peroxidase (SIGMA) diluída 1/2.000 em solução de bloqueio. Após 1 h de incubação a T.A., as placas foram lavadas 10 vezes com PBS-Tween e então adicionou-se 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 ELISA (Multiskan Thermo Labystems®) com filtro de 492 nm e filtro de referência de 620 nm.

#### Avaliação da deposição de colágeno no peritônio

A membrana peritoneal de animais infectados ou não infectados foi coletada e fixada em formalina tamponada a 10%. O material foi processado pelo método de inclusão em parafina. As lâminas foram coradas pelo picro-sirus e examinada em microscopia sob luz polarizada com objetiva de 40x. O colágeno foi quantificado por toda a extensão da membrana peritoneal após a fotografia de 30 campos por animal que foram analisados no programa Image J (NIH).

#### Avaliação da atividade de Arginase

As células obtidas como descrito anteriormente foram alicotadas em microtubos contendo  $1 \times 10^6$  células em solução de PBS e lisadas com 5µl de 0,1% Triton X-100. Após 30 min de incubação foram adicionados 100µl de 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) e 20 µl de 10 mM MnCl<sub>2</sub> para a ativação da enzima pela incubação a 56°C por 10 min. A hidrólise da L-arginina foi conduzida pela incubação de 100 µl desse lisado com 100 µl de 0,5 M de L-arginina (pH 9.7) a 37°C por 60 min. A etapa seguinte foi realizada em placa de 96 poços de fundo U (Corning, New York 14831, USA) para detecção da uréia

e por comparação com uma curva padrão começando 80mg/dl contendo diluições seriadas em duplicatas de 200 µl em placa de 96 poços (Corning). Nesta etapa a uréia foi avaliada utilizando 5 µl da amostra pelo Kit UREA 500 (Doles, Goiânia, GO, Brasil) segundo instrução do fabricante. A densidade óptica (D.O.) foi detectada por leitor de ELISA com um filtro de 620 nanômetros. Os resultados foram expressos como atividade da enzima em unidades. Uma unidade (U) foi definida como quantidade de uréia/dL produzida por  $2,5 \times 10^4$  células por hora.

#### Cultura de Células peritoneais

As células obtidas no item análise das células do lavado peritoneal foram lavadas e incubadas a  $1,5 \times 10^6$  células/500µl em placa de cultura de tecido de 24 poços (Corning). A incubação foi feita por 48 horas meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SBF, 2µM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µM de 2-mercaptoetanol a 36°C, em 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Dosagem de Óxido nítrico (NO)

Após 48 horas de incubação, o sobrenadante de cultura das células foi removido para quantificação do produto de oxidação estável do óxido nítrico, o nitrito. A concentração de nitrito foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (Green et al, 1982), por comparação com uma curva padrão começando 100 µm. A revelação foi feita através da adição de solução de Griess (1:1) contendo 50 µl sulfanilamida a 1% e 50 µl N-naftil-etilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%. Após dez minutos à temperatura ambiente, foi feita a leitura utilizando-se leitor ELISA com um filtro de 550 nanômetros.

#### Anticorpos para ELISA e Imunocitoquímica

Os hibridomas C17.8 e C15.6 foram doados pelo Dr. Giorgio Trinchieri (Instituto Nacional do Câncer, EUA). Os hibridomas XMG 1.2, 11B11, ASN18 e RB6-8C6 (anti Ly6C/G) foram doados pela Dr<sup>a</sup> Glória Maria Collet de Araújo Lima (UFG).

O hibridoma ER-MP23 (anti CD301, ou receptor para N-acetil galactosamina) foi doado pelo Dr. Pieter Leenen (Universidade de Erasmus de Rotterdam, Rotterdam, Holanda). Anticorpos totais de rato (controle) foram purificados em coluna de proteína G de soro de rato Wistar e os demais anticorpos purificados a partir de sobrenadante de cultura dos hibridomas.

#### Imunocitoquímica para detecção de células CD 301+ e Ly6C/G+

Para análise dos marcadores de superfície  $2 \times 10^5$  células obtidas no item análise das células do lavado peritoneal foram centrifugadas em citocentrífuga (FANEM) para confecção de lâminas para microscopia. As amostras em lâminas foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização dos exames. Após o descongelamento das lâminas, foi feito o bloqueio com (PBS contendo 5% SFB) por 20 min à temperatura ambiente (TA). Após esse período, foi feita a lavagem com PBS-tween e adicionou-se 80  $\mu\text{L}$  de solução de anticorpo purificados na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em solução de bloqueio. O anticorpo IgG total de rato foi usado como controle negativo na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em solução de bloqueio. Após incubação por 1 h, em câmara úmida, à  $4^\circ\text{C}$ , as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS-tween e adicionou a solução de anticorpos anti-IgG biotilado (Amersham Pharmacia) na concentração de 1:500 diluídas em solução de bloqueio e incubadas por 40 min em câmara úmida. Após incubação, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS-tween secadas cuidadosamente e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do conjugado extreptoavidina® - peroxidase (SIGMA) na concentração de 1:500 em solução de bloqueio, incubadas entre  $4^\circ$  a  $8^\circ\text{C}$  em câmara úmida por 40 min. As lâminas foram lavadas por dez vezes com PBS-tween 20 e adicionou-se a solução do substrato (17,5ml de PBS contendo 2,5 mg diaminobenzidine – DAB, Sigma) mais 5  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogenio 30%.

A reação foi parada com água destilada e a contra-coloração com verde metila (Amersham Pharmacia). Colocou-se 100  $\mu\text{L}$  do corante e aguardou-se 5 min para retirar o corante mergulhando a lâmina dentro de um béquer com água destilada. Todas as lâminas foram analisadas sob microscopia de luz utilizando aumento de 10x, 40x e 100x e a frequência de células positivas foi determinada contando-se 1000 células por lâmina.

## Análise Estatística

Para a análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. Em seguida, as variáveis foram testadas utilizando o programa *Prisma 4.0* utilizando-se o Teste de ANOVA seguido por Bonferroni. Foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Caracterização e quantificação dos cisticercos presente na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c em diferentes tempos de infecção

A infecção experimental por *T. crassiceps* é caracterizada pela presença de numerosos cisticercos na cavidade peritoneal. O cisticerco na fase inicial apresenta-se pequeno e translúcido, podendo aumentar o seu tamanho agora apresentando brotamentos sendo denominado cisticerco na fase larval. No decorrer de seu desenvolvimento, ele se torna mais opaco com numerosos brotamentos, provavelmente entrando em uma fase de destruição, sugerindo que sua viabilidade está alterada. Estes últimos são denominados de cisticercos na fase final (FIGURA 1). Para verificar o perfil de multiplicação dos cisticercos durante a infecção experimental em camundongos BALB/c, os parasitos nas três fases foram quantificados em diferentes tempos após a infecção. No sétimo dia após a infecção foi possível recuperar uma pequena quantidade de parasitos da cavidade peritoneal dos animais (FIGURA 2). Nesta fase, a maior parte dos cisticercos encontrava-se na fase inicial ( $2,37 \pm 2,72$ ), sendo que raramente encontrou-se cisticerco na fase final ( $0,5 \pm 1,4$ ). Entretanto, este maior número de cisticercos na fase inicial não foi estatisticamente diferente do número de cisticercos na fase final. A ausência de uma confirmação estatística se deve a não recuperação de cisticercos em nenhuma das fases em vários animais. Quatorze dias após a infecção foi recuperado um número total de cisticercos estatisticamente maior que no sétimo dia após a infecção, indicando uma grande proliferação dos parasitos, os quais passaram de um total de  $3,62 (\pm 3,5)$  no sétimo dia após a infecção para  $83 (\pm 45,3)$  no 14º dia. Neste último período e nos demais períodos não foram observados predominância de parasitos em nenhuma das fases, ou seja, o número de cisticercos na fase inicial, larval e final é similar em todos os tempos de infecção. Nos dias subsequentes da infecção observa-se um aumento significativo do número total de parasitos, exceto entre o 28º e 42º dias, onde se observa um controle dos parasitos ( $359 \pm 105$  no 28º dia e  $358 \pm 40$  no 42º dia). Ao se comparar o número de parasitos na fase inicial no 28º dia após a infecção com parasitos na fase inicial nos 42 dias, observa-se uma quantidade significativamente menor no 42º dia após a infecção, indicando que o controle do crescimento dos

parasitos foi devido ao controle destes na fase inicial. O número de cisticercos volta a crescer, sendo que no 84º dia após a infecção observa-se que os animais apresentavam dificuldade para caminhar e para se alimentar, devido ao grande volume da cavidade peritoneal. Este período foi definido como limite para manutenção da infecção experimental. Nesta data o número total de cisticercos foi em média de 1022 ( $\pm 230$ ), sendo 333,75 ( $\pm 191,9$ ) na fase inicial; 337,12 ( $\pm 101,6$ ) na fase larval e 351,3 ( $\pm 108,12$ ) na fase final.

O aumento do número de cisticercos durante a infecção promoveu um aumento do volume da cavidade abdominal e do exsudato inflamatório no local, o que proporcionou um aumento gradual do peso dos animais. Desta forma, o peso dos animais infectados foi significativamente maior que o dos animais controle não infectados a partir do 35º dia após a infecção (FIGURA 3). Para avaliar se o aumento do peso dos animais pode ser utilizado como um parâmetro de gravidade da doença foi feita uma correlação entre o peso e o número total de cisticercos, a qual foi positiva como pode se observar na FIGURA 4 (Pearson  $r = 0,96$ ). Vale ressaltar que no período entre o 28º e 42º dias após a infecção, o número total de cisticercos não alterou, mas o peso do animal aumentou, provavelmente devido ao aumento do exsudato inflamatório na cavidade peritoneal (FIGURAS 3 e 4).

#### Perfil de citocinas séricas durante a cisticercose experimental.

O controle do parasito e as alterações patológicas desencadeadas pelo patógeno dependem da resposta imune do hospedeiro, sendo que as citocinas produzidas pelo hospedeiro durante a infecção irá direcionar o tipo de resposta imune gerada. A produção de  $IFN\gamma$ , relacionada ao perfil Th1 de resposta está associada à ativação da resposta imune celular e ao controle dos cisticercos. A quantidade desta citocina no soro dos animais não infectados foi inferior ao limite de detecção da técnica (0,1ng/mL) executada nestes experimentos. No soro dos animais infectados, o  $IFN\gamma$  foi significativamente superior ao limite de detecção no 28º dia após a infecção (0,78 ng/mL  $\pm$  0,92 ng/mL), atingindo níveis de 8,7 ( $\pm 5,2$ ) ng/ml no 84º após a infecção (FIGURA 5A). Outra citocina relacionada ao perfil Th1 é a IL-12, que foi detectada em níveis acima dos encontrados em animais controles apenas no 56º dia após a infecção. A produção foi ainda maior no 84º dia após a infecção, atingindo níveis de aproximadamente 7,24 ( $\pm 4,4$ ) ng/ml (FIGURA 5B). A IL-4, citocina do perfil Th2 que

está relacionada com susceptibilidade à *T. crassiceps* foi detectada em níveis significativamente acima do limite de detecção (0,1 ng/mL) apenas a partir do 42º dia após a infecção (FIGURA 5C), sendo que não foi possível detectar esta citocina nos animais controles. Esta alta produção de IL-4 foi mantida no 56º e 84º dias após a infecção. Estes dados sugerem um perfil misto durante toda a infecção, mostrando uma resposta do tipo Th1 sistêmica mais precoce que uma resposta Th2 (FIGURA 5 A, B e C).

#### Caracterização das células inflamatórias presente no lavado peritoneal

No decorrer da infecção pode ser observada a formação crescente de um intenso exsudato, rico em células inflamatórias na cavidade peritoneal. Analisando estas células, observa-se que os macrófagos foram mais abundantes durante toda a infecção e que os polimorfonucleares foram as células que apresentaram uma variação de 10% a 40% (FIGURA 6). O número de linfócitos foi praticamente constante nos animais infectados por toda a infecção, mantendo-se em torno de 5% das células presente no lavado. No 14º dia após a infecção o número de PMN alcançou 42% das células da cavidade peritoneal, mantendo-se alto até o 28º dia e retornando para valores normais menores que 20% nos períodos subseqüentes. Das células mononucleares, os macrófagos foram os mais abundantes, totalizando em média 60% a 85% das células presente no lavado, sendo que no final da infecção observou-se apenas 50% (FIGURA 6).

A caracterização fenotípica das células no exsudato peritoneal também foi feita por imunocitoquímica utilizando-se dois anticorpos monoclonais. O primeiro foi o ER-MP23, anticorpo específico para o receptor de N-acetil-galactosamina. Células portando este marcador compõem 15% das células presentes na cavidade peritoneal de animais controles, porém estas células aumentaram para 36% no 14º dia após a infecção (FIGURA 7A). Este valor acima de 35% de células positivas foi observado nos períodos subseqüentes da infecção. O outro anticorpo utilizado foi o RB6-8C5, específico para Ly6C/G presente principalmente em granulócitos, mas também presentes em células plasmocitóides dendríticas e macrófagos inflamatórios recém migrados para o sítio da inflamação. A presença de células portando o marcador Ly6C/G foi observada em valores inferior a 5% nos animais não infectados, porém este número sobe para 11% no sétimo dia de infecção, mantendo-se sempre superior a 10% até no final do experimento (FIGURA 7B).

## Caracterização funcional dos macrófagos no exsudato inflamatório.

Macrófagos no ambiente de inflamação podem ser ativados por constituintes de patógenos, moléculas de superfície celular e fatores solúveis liberados pelas células do hospedeiro como as citocinas. CMø produzem NO dependente da iNOS enquanto AAMø produzem ornitina e uréia pela enzima arginase-1, sendo que ambas as enzimas usam a L-arginina como substrato. Para caracterizar o perfil funcional dos macrófagos presentes no exsudato inflamatório foi avaliada a produção espontânea de NO em sobrenadante de cultura de células peritoneais após 48 h de cultura e a atividade de arginase presente nas células recém removidas da cavidade peritoneal do hospedeiro.

A produção de NO foi constante durante toda a infecção e semelhante àquela encontrada em células de animais não infectados, exceto no 84º dia após a infecção quando a produção de óxido nítrico foi significativamente menor (FIGURA 8). A atividade de arginase das células peritoneais dos animais não infectados foi menor que 10U durante todo o período. Células peritoneais de animais infectados apresentaram uma grande atividade de arginase já no 7º dia após a infecção (28U). Esta atividade no 21º dia após a infecção alcançou 36U, aumentando para 48 U no 84º dia após a infecção (FIGURA 9).

## Depósito de colágeno no peritônio

A enzima arginase usa como substrato a L-arginina para a formação de ornitina e uréia. A ornitina é convertida pela ornitina aminotransferase em prolina, um importante aminoácido constituinte do colágeno. Para verificar se o aumento da atividade de arginase nas células peritoneais relaciona-se com um aumento da deposição de colágeno no peritônio, o colágeno na serosa peritoneal foi quantificado durante a infecção. Como pode ser observada na FIGURA 10, a quantidade de colágeno reduziu na fase inicial da infecção, sendo significativamente menor que no controle no 14º dia após a infecção. Nos dias subseqüentes, a quantidade de colágeno no peritônio dos animais infectados começa a crescer, atingindo uma quantidade significativamente maior que nos animais controles a partir do 56º dia.



Figura 1: Características macroscópicas de cisticercos de *T. crassiceps* nos diferentes estágios de diferenciação retirados de camundongos BALB/c 60 dias após a infecção com 10 cisticercos em fase inicial. (A) cisticerco em fase inicial; (B) cisticerco em fase larval e (C) cisticerco em fase final.

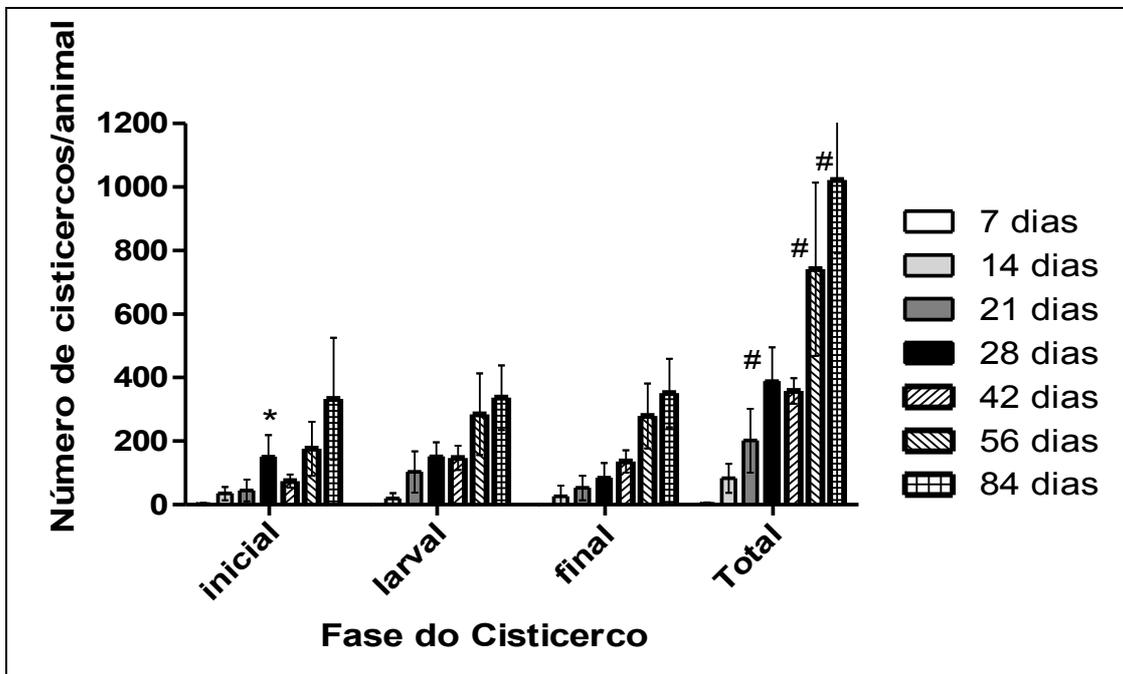


Figura 2: Número de cisticercos de *T. crassiceps* recuperados de camundongos BALB/c em diferentes períodos após a infecção de acordo com estágio de diferenciação. Os cisticercos foram removidos da cavidade peritoneal de animais infectados em diferentes dias após a infecção e quantificados de acordo com o estágio de diferenciação. As barras apresentam a média ( $\pm$ SD) do número de cisticercos recuperados em cada fase \* indica diferença significativa entre o número de cisticercos recuperados em uma fase com o número de cisticercos recuperados na mesma fase em tempo imediatamente posterior ou anterior ( $P < 0,05$ ); # indica diferença significativa entre o número de cisticercos recuperados em uma fase com o número de cisticercos recuperados na mesma fase em tempo imediatamente anterior ( $P < 0,05$ )

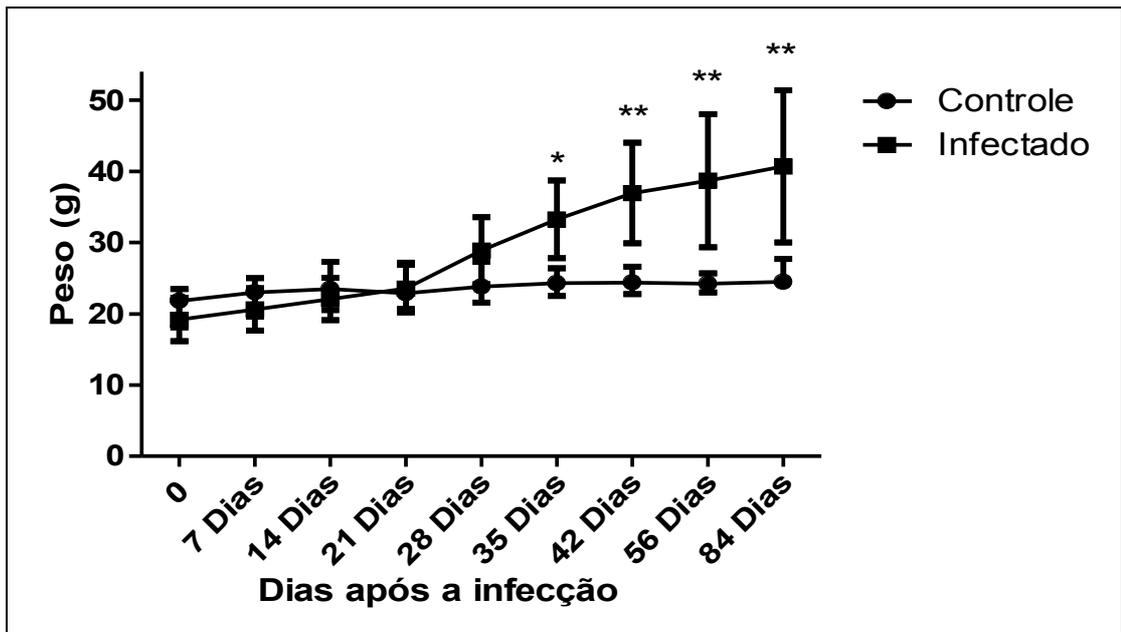


Figura 3: Peso médio dos camundongos BALB/c infectados com cisticercos de *T. crassiceps* em diferentes períodos após a infecção. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e o peso dos animais medido semanalmente. Os dados representam à média ( $\pm$ SD) do peso dos animais nos diferentes tempos. \* indica diferença significativa entre o peso dos animais controles com o dos animais infectados no mesmo tempo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). (n=5)

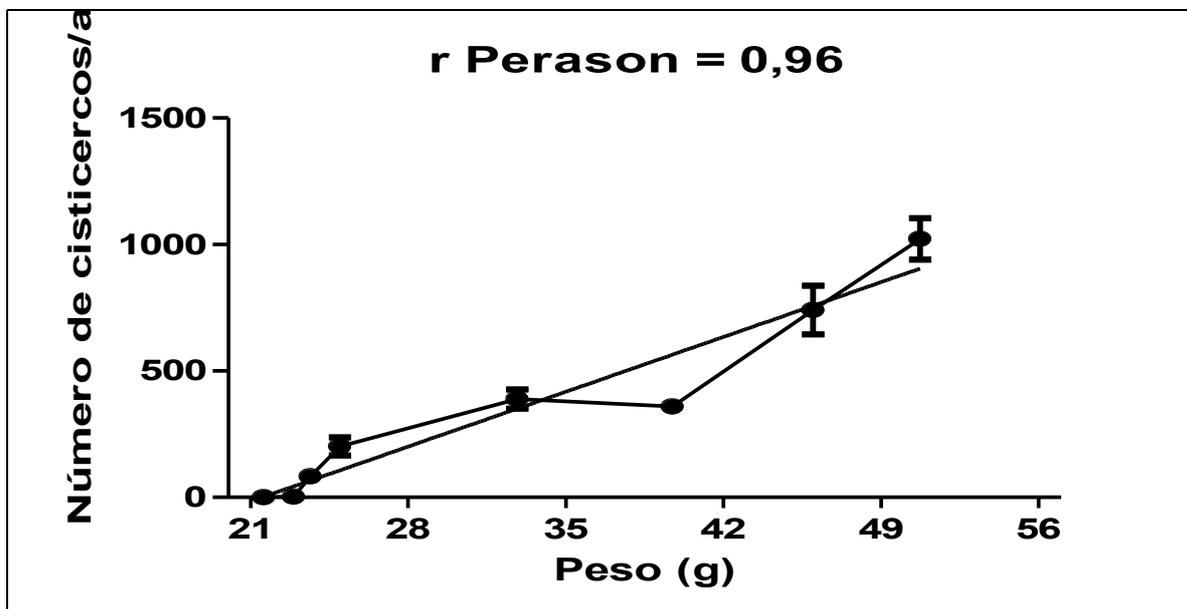


Figura 4: Análise de correlação entre o número total de cisticercos recuperados dos 5 animais por cada dia experimental e o peso. Os dados representam a média ( $\pm$ SD) do número de cisticercos totais nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 84 dias após a infecção. (n=5)

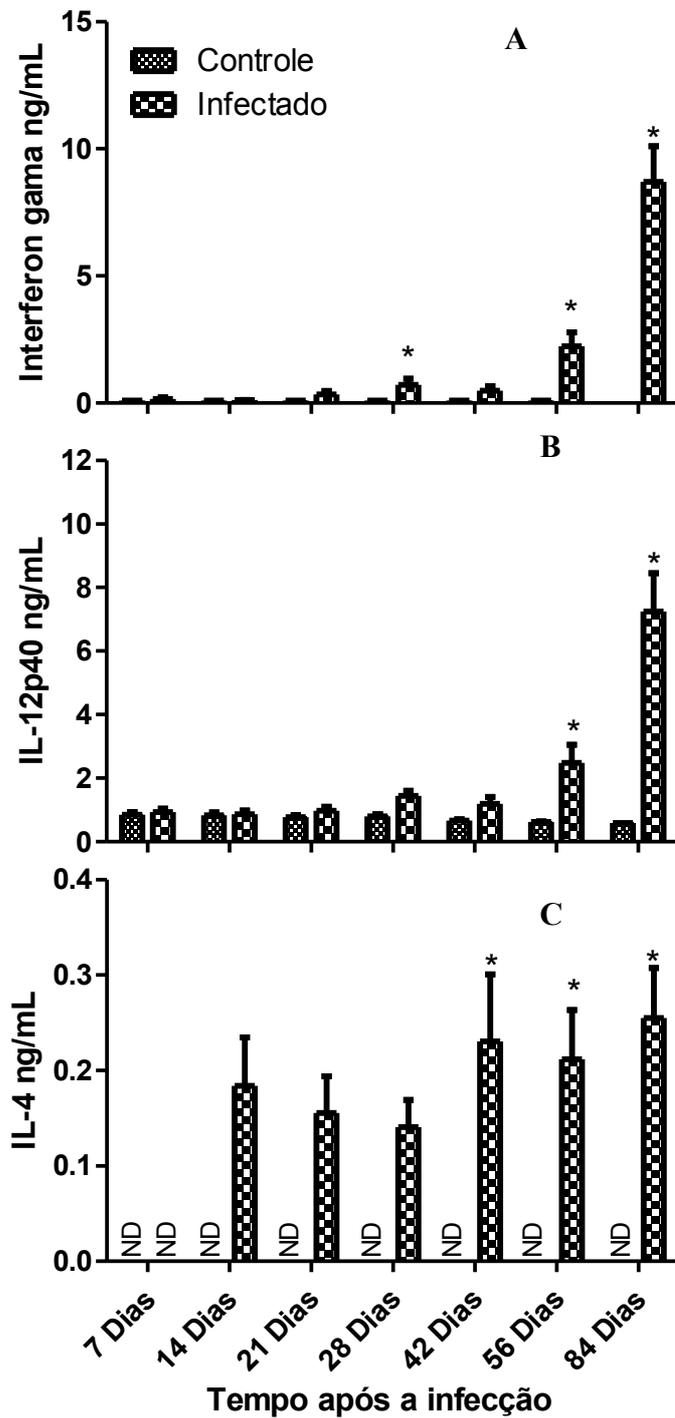


Figura 5: Citocinas presentes no soro de camundongos infectados ou não com cisticercos de *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial as citocinas IFN $\gamma$  (A) IL-12p40 (B) e IL-4 (C) foram quantificadas no soro dos animais nos diferentes tempos. As barras representam a média ( $\pm$ SD) de pelo menos 5 animais. \* indica produção significativamente maior que a dos controles no mesmo período (A e B) ou que a do limite de detecção de 100 pg (C) (\*  $p < 0,05$ ). ND significa valor abaixo do limite de detecção.

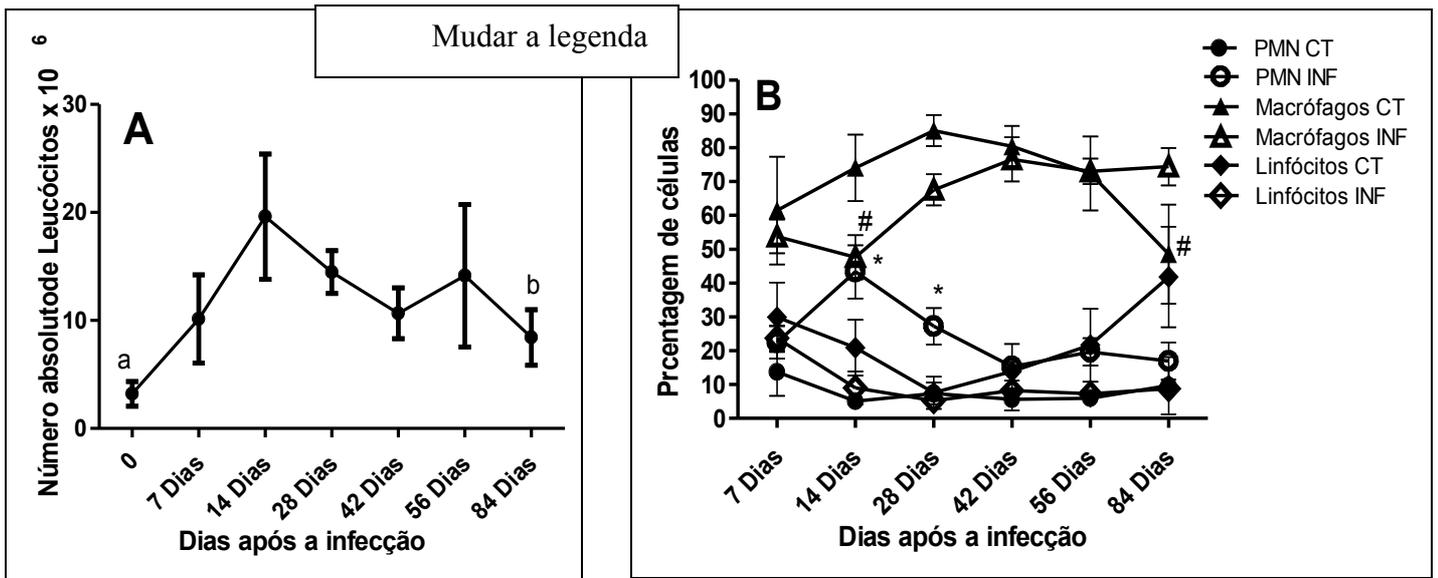


Figura 6: Número absoluto de leucócitos recuperados (A) e Porcentagem das diferentes populações celulares (B) na cavidade peritoneal de camundongos infectados ou não com *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e eutanasiados nos diferentes tempos. As células na cavidade peritoneal foram colhidas e coradas pelo corante panótico. Os símbolos representam a média  $\pm$ SD do número absoluto ou porcentagem de células presentes na cavidade peritoneal de pelo menos 3 animais. *a* indica diferença estatística entre controle e infectados, *b* diferença estatística diferença entre o número absoluto de leucócitos entre o 14 e 84 dias \* indica diferença estatística entre PMN de animais controles e infectados no mesmo período ( $p < 0,05$ ). # indica diferença estatística entre PMN de animais controles e infectados no mesmo período ( $p < 0,05$ ). CT - animais controles e INF - animais infectados

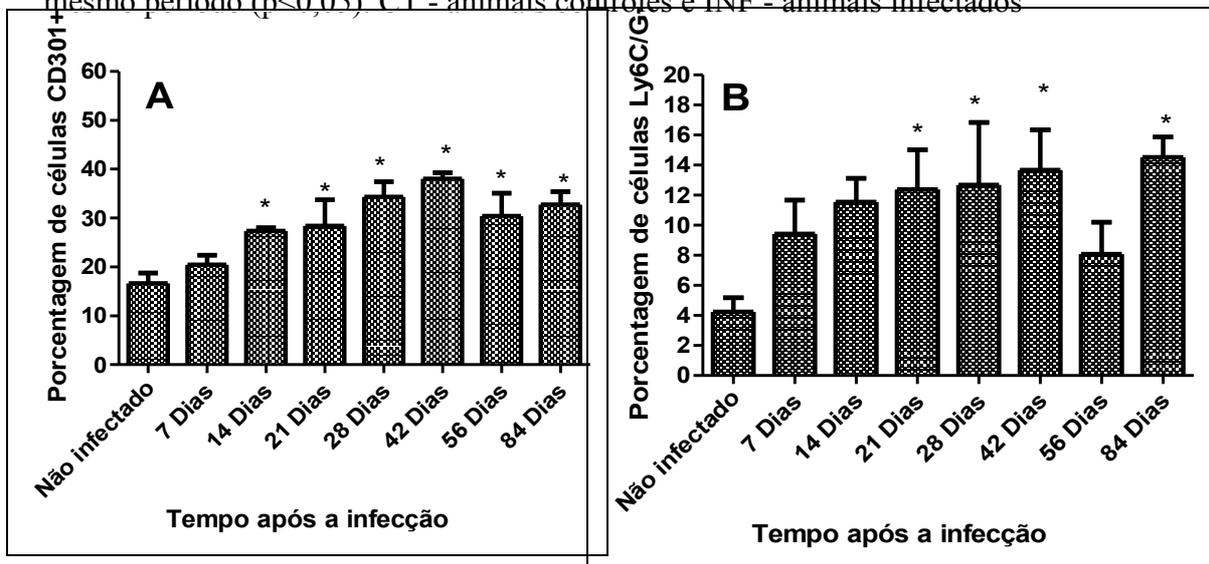


Figura 7: Porcentagem de células portadoras dos marcadores e CD301 (A) Ly6G/C (B) na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e eutanasiados nos diferentes tempos. As células na cavidade peritoneal foram colhidas e marcadas por imunocitoquímica e contadas em microscopia ótica. Os símbolos

representam a média  $\pm$ SD da porcentagem de células presentes na cavidade peritoneal de pelo menos 5 animais.).

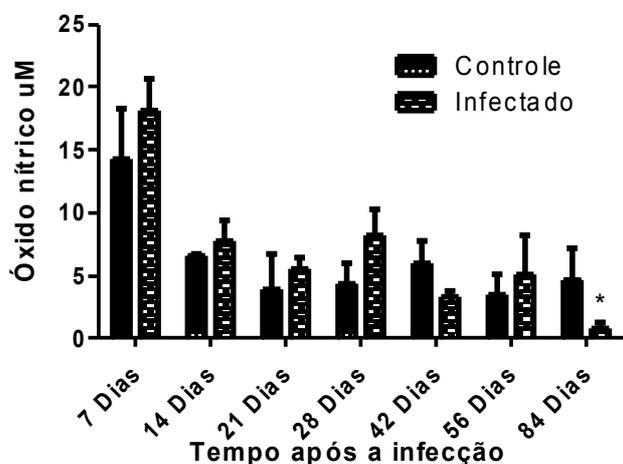


Figura 8: Produção de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos infectados com *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e eutanasiados nos diferentes tempos. As células na cavidade peritoneal foram colhidas e cultivadas por 48 h em estufa a 36°C. A quantidade de óxido nítrico foi avaliada no sobrenadante de cultura pela reação de Griess. As barras representam a média  $\pm$ SD da produção de óxido nítrico de pelo menos 4 animais. \* indica diferença estatística entre animais controles e infectados no mesmo período ( $p < 0,05$ ).

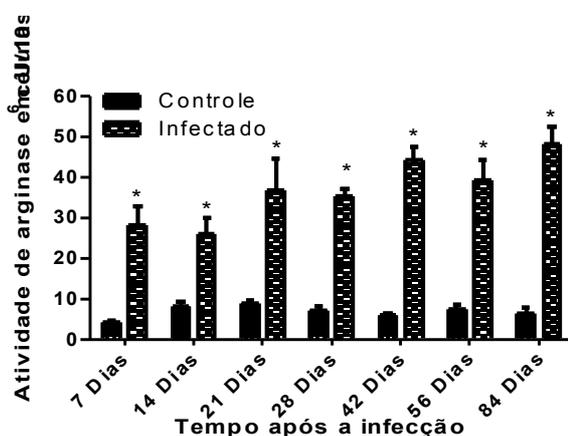


Figura 9: Atividade de arginase de células peritoneais de camundongos infectados com *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e eutanasiados nos diferentes tempos. As células na cavidade peritoneal foram colhidas e a atividade de arginase foi avaliada como descrito nos materiais e métodos. As barras representam a média  $\pm$ SD da atividade de arginase de pelo menos 4 animais. \* indica diferença estatística entre animais controles e infectados no mesmo período ( $p < 0,05$ ).

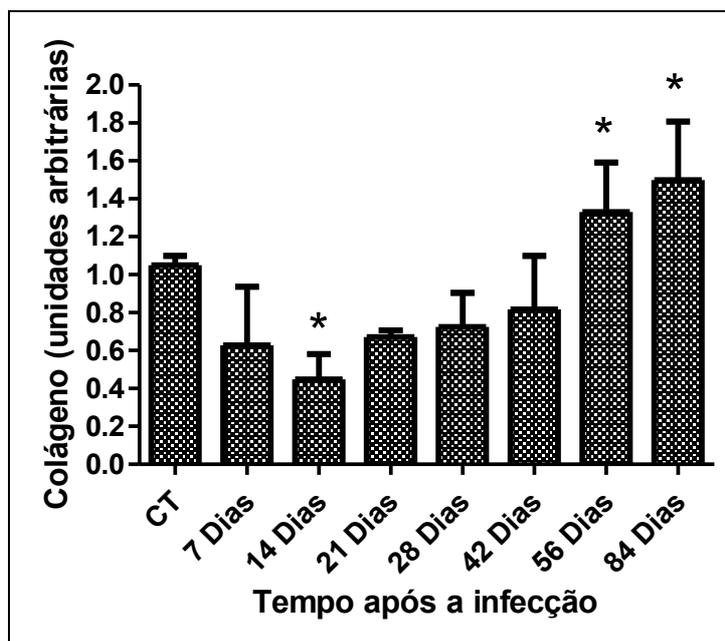


Figura 10: Deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados com *T. crassiceps*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos em fase inicial e eutanasiados nos diferentes tempos. As barras representam a média  $\pm$ SD da quantidade de colágeno de pelo menos 3 animais. \* indica diferença estatística entre animais controles e infectados ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

Cisticercos de *T. crassiceps* inoculados na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c multiplicam-se por brotamento, ocupando uma grande extensão do abdômen e provocando uma distensão e acúmulo de líquidos e de leucócitos no local. A gravidade da doença depende do número de cisticercos presentes na cavidade peritoneal, sendo que há uma correlação positiva entre o número de cisticercos e o aumento do peso dos animais. Este dado indica que a pesagem dos animais pode ser uma forma de avaliar a gravidade da doença.

Todas as alterações nos parâmetros analisados como o peso, quantificação e qualificação dos parasitos, dosagens de citocinas séricas, porcentagem e fenótipo das células, produção de óxido nítrico e atividade da arginase até o 28º de infecção foram pequenas. Pode-se perceber uma pequena proliferação de cisticercos, mas não é detectado aumento do volume abdominal ou peso dos animais. A integridade dos órgãos da cavidade abdominal é preservada (dados não mostrados) e não se detecta citocinas pertencentes ao perfil Th1 ou Th2 no soro. No 14º dia destaca-se o aumento significativo de PMN que não é acompanhado por um aumento significativo de células Ly6C/G+. Neste período, os cisticercos proliferam-se lentamente, provavelmente devido a um controle mediado pela ação de NO induzido por IFN $\gamma$  (Alonso-Trujillo et al. 2007), embora não seja possível detectar IFN $\gamma$  ou qualquer outra citocina no soro neste período (Figura 5; (Spolski et al. 2000, Toenjes and Kuhn 2003, Toenjes et al. 1999). A produção de NO ex-vivo por células peritoneais também não se altera em relação aos animais não infectados neste período (Figura 9; (Toenjes and Kuhn 2003)). A atividade da enzima arginase está aumentada nas células peritoneais já no sétimo dia após a infecção e a presença de células portando o marcador CD301 aumenta significativamente no 14º dia. O CD301 é expresso na maioria dos macrófagos residentes na pele, porém a expressão desta proteína em macrófagos no tecido inflamado está relacionada ao perfil de AAM $\emptyset$  (Dupasquier et al. 2006). Estes dados sugerem que macrófagos são ativados para o perfil de AAM $\emptyset$  no sítio da infecção já nas primeiras semanas após o inóculo dos parasitos. Até o 21º dia após a infecção, as alterações encontradas são pouco diferentes das já descritas. Em torno do 28º dia após a inoculação pode-se detectar a presença significativa de IFN $\gamma$  no soro dos animais, o que

está de acordo com trabalhos anteriores (Toenjes et al. 1999). O número de cisticercos continua aumentando e o peso dos animais aumenta em relação aos controles não infectados, embora este aumento não seja estatisticamente significativo. A quantidade de células PMN continua alta na cavidade peritoneal, corroborando trabalhos anteriores (Padilla et al. 2001). Entretanto, este aumento pode ser associado ao aumento de células Ly6C/G+. A produção espontânea de NO por células peritoneais permanece inalterada e a atividade de arginase permanece alta, assim como os marcadores de AAMø.

No período subsequente, entre o 28 e 42° dias após a infecção, o número total de cisticercos não se altera, mas o número de cisticercos recuperados em fase inicial no 42° dia é significativamente menor que os recuperados no 28° dia, indicando que a resposta imune foi parcialmente eficiente para controlar a proliferação do patógeno nesta fase. A maior atividade microbicida nesta fase também foi sugerida anteriormente por outros autores, os quais demonstraram que os parasitos recuperados da cavidade peritoneal após o 42° dia de infecção têm uma viabilidade maior que a dos parasitos recuperados em períodos anteriores (Spolski et al. 2000). Porém, os mecanismos de ataque aos cisticercos não é capaz de manter o número de parasitos constante por muito tempo. Embora o IFN $\gamma$  no soro dos animais infectados continua superior ao encontrado nos animais controles a partir do 28° dia de infecção, a produção de IL-4 sistêmica torna-se significativamente superior à dos animais controles apenas após o 42° dia de infecção, indicando que uma resposta Th1 precede a resposta Th2 na infecção por *T. crassiceps*, como descrito anteriormente para resposta imune local (Terrazas et al. 1998).

As células PMN retornam aos níveis normais no 42° dia após a infecção, porém a porcentagem de células Ly6C/G+ permanece alta. O anticorpo utilizado neste trabalho, o clone RB6-8C5, é amplamente utilizado para marcar neutrófilos, célula que expressa grande quantidade de Ly6G. Porém, outras células como células dendríticas plamocitóides e macrófagos supressores também são marcados por este clone de anticorpo (Asselin-Paturel et al. 2001, Edwards et al. 2006, Geissmann et al. 2008). Além disto, macrófagos inflamatórios expressam uma grande quantidade de Ly6C, que é ausente em neutrófilo, mas também é reconhecido pelo anticorpo RB6-8C5 (dos Santos et al. 2008, Geissmann et al. 2008, Mordue and Sibley 2003). Esses dados indicam que células Ly6C/G+, que não são neutrófilos, começam a participar da resposta imunológica em torno do 42° dia de infecção. Gomez-Garcia et al. mostraram que fatores solúveis de macerados de cisticercos, os quais são compostos principalmente de carboidratos, são capazes de induzir a migração de células Ly6C/G+

com atividade supressora, além de induzir a expressão de marcadores de AAMø (Gomez-Garcia *et al.* 2005, Gomez-Garcia *et al.* 2006).

Os AAMø foram descritos como células relacionadas à imunossupressão, principalmente pela capacidade de secretar citocinas imunossupressoras como a IL-10 e o TGFβ, apresentação de antígenos favorecendo a ativação de células Th2 e depleção de arginina pela ação da arginase (Martinez *et al.* 2009, Pesce *et al.* 2009). Esta última inibe a proliferação de linfócitos Th1 e Th2 (Pesce *et al.* 2009). Entretanto, os AAMø também podem participar diretamente do controle de helmintos por secreção de quitinases que podem lesar o tegumento do patógeno, depleção do aminoácido L-arginina que é importante para a proliferação celular ou outros mecanismos ainda não conhecidos (Anthony *et al.* 2007, Maizels *et al.* 2009).

Neste trabalho não foi observado um aumento significativo na porcentagem dos marcadores de AAMø, baseado nos receptores CD301 e atividade da arginase, após o 28º de infecção. Porém, observa-se que há uma diminuição na capacidade do hospedeiro em controlar a infecção após este período. Este dado sugere que outros fatores, além da simples presença de AAMø, podem ser mais importantes na inibição da resposta imune para favorecer a proliferação do patógeno. Diversos são os mecanismos que os cisticercos possuem para inibir a ação microbicida do sistema imune. A superfície do parasito é recoberta por uma camada de polissacarídeo que dificulta a ativação do complemento na parede do cisto (White 2000). A ação da via clássica do complemento também é inibida pela paramiosina presentes no parasito (Laclette *et al.* 1990). Fatores secretados pelo cisticercos induzem a produção de prostaglandinas e proteínas de baixo peso molecular que diminuem a inflamação e alteram a produção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares (Arechavaleta *et al.* 1998). O cisticercos secreta proteases capazes de degradar IL-2 e imunoglobulinas além de possuírem antígenos que induzem apoptose de linfócitos TCD4+ e CD19+ (Lopez-Briones *et al.* 2003, White 2000).

Os AAMø também foram descritos como importantes células para promoverem o reparo tecidual e favorecerem a formação de fibrose em infecções crônicas (Anthony *et al.* 2007, Thompson *et al.* 2008, Wynn *et al.* 2004). Este aumento da fibrose foi sugerido pela grande expressão da enzima arginase 1 nestes macrófagos. Esta enzima favorece a síntese de colágeno pelo aumento da disponibilidade de ornitina e posteriormente de prolina, principal aminoácido constituinte do colágeno (Thompson *et al.* 2008, Wynn *et al.* 2004). Neste trabalho, o colágeno presente no peritônio foi

significativamente reduzido no 14<sup>o</sup> dia de infecção e aumentou nos tempos subseqüentes tornando-se superior ao encontrado nos animais controles após o 56<sup>o</sup> dia de infecção. A formação de fibrose em um tecido que sofreu injúria depende de vários fatores. Geralmente, na fase da injúria observa-se a liberação de metaloproteinases que são capazes de degradar o colágeno e os componentes da matriz extracelular para favorecer a migração de células para o tecido. Esta fase é seguida por uma fase inflamatória com intensa migração de leucócitos (Wilson and Wynn 2009). Os leucócitos que migram são altamente regulados por citocinas e quimiocinas produzidas pelas células no sítio da inflamação e por constituintes dos patógenos, caso estes estejam presentes. Um balanço entre citocinas anti-fibróticas como IFN $\gamma$  e TNF e citocinas pró-fibróticas IL-13, IL-4 e TGF $\beta$  vão inibir ou estimular a proliferação e diferenciação de fibroblastos para se transformarem em células secretoras de colágeno, formando então o tecido fibroso (Wilson and Wynn 2009). A síntese de colágeno pelos fibroblastos é dependente da L-arginina e da enzima arginase, sendo que a arginase de fibroblastos parece ser mais importante que a arginase de macrófagos para a formação da fibrose (Thompson et al. 2008). Na verdade, a arginase AAM $\emptyset$  foi capaz de inibir a síntese de colágeno no modelo de granuloma por ovos de *Schistosoma mansoni* (Pesce et al. 2009). Nossos dados mostram que na fase tardia da infecção por cisticercos de *T. crassiceps* ocorre um aumento da produção de IL-4 sistêmica, o que favorece a geração de células Th2 produtoras de IL-4 e IL-13, as quais podem favorecer a proliferação dos fibroblastos e aumento da síntese do colágeno na fase crônica da infecção. Porém, não foram observada alterações significativas em marcadores de AAM $\emptyset$  que associassem estas células com o aumento da deposição do colágeno no peritônio na fase crônica da infecção.

Neste trabalho foi demonstrado que os AAM $\emptyset$  podem ser observados nas primeiras semanas após a infecção experimental com cisticercos de *T. crassiceps*, quando ocorre também um controle da proliferação do parasito e degradação do colágeno no peritônio. No decorrer da infecção, a capacidade de controlar os parasitos diminui, uma resposta sistêmica Th1 muda para uma resposta mista Th1/Th2 e a presença de AAM $\emptyset$  e da atividade da arginase na cavidade peritoneal sofre pouca alteração em relação à fase inicial da infecção. A quantidade de colágeno no peritônio que foi reduzida nas primeiras semanas após a infecção aumenta após o 42<sup>o</sup> da infecção, ao mesmo tempo em que aumenta a citocina IL-4. Desta forma, a deposição do

colágeno no peritônio relaciona-se mais com a presença de citocinas do perfil Th2, como a IL-4 do que com a presença de AAMø.

## Referências

- Agapejev Svetlana, 2003. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*: 61(3-B):822-828.
- Ahmed SF, Oswald IP, Caspar P, Hieny S, Keefer L, Sher A, and James SL 1997. Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 65: 219-226.
- Albuquerque ES, Galhardo I. 1995. Neurocysticercosis in the State of Rio Grande do Norte: report of 8 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 53:464-470.
- Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, and Terrazas LI 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res* 100: 1341-1350.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadelcker MJ, and Gause WC 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7: 975-987.
- Arechavaleta F, Molinari JL, and Tato P 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84: 117-122.
- Arocker-Mettinger E, Huber-Spitzy V, Auer H, Grabner G, and Stur M 1992. [*Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye. A case report]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 201: 34-37.
- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, and Trinchieri G 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2: 1144-1150.
- Atochina O, Da'dara AA, Walker M, and Harn DA 2008. The immunomodulatory glycan LNFPIII initiates alternative activation of murine macrophages in vivo. *Immunology* 125: 111-121.
- Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D, McGuire E, and Harn DA 2001. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 167: 4293-4302.
- Ballek D., Takla M., Isingvolmer S., Stoye M. 1992a. The helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes*) in 3 districts of Middle Germany – Part 1: Cestodes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 99, 362–365.
- Ballek D., Takla M., Isingvolmer S., Stoye M. 1992b. The helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes*) in 3 districts of Middle Germany – Part 2: Nematodes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 99, 435–437.
- Brojer, C. M., A. S. Peregrine, I. K. Barrer, R. A. Carreno, and C. Post. 2002. Cerebral cysticercosis in woodchuck (*Marmota monax*). *Journal of Wildlife Diseases* 38: 621–624.

- Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, and Theoharides TC 2003. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 86: 123-129.
- Couldwell, W.T., Apuzzo, M.L.J. 1992. Cysticercosis cerebri. **Neurosurg Clin North Am**, v.3, n.2, p.471-481.
- de Oliveira B.H., Rodrigues R. M., Barcelos I. S. C., Silva L. P. & Costa-Cruz J. M. 2006. Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a central-western region of Brazil. *Inst. Trop. S. Paulo* 48(1):49-52.
- Del Brutto OH, and Sotelo J 1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 10: 1075-1087.
- Del Brutto OH, Sotelo J. 1988. Neurocysticercosis: an update. *Reviews of Infectious Diseases* 10:1075-1087.
- Dissanayake S, and Shahin A 2007. Induction of interferon-gamma by *Taenia crassiceps* glycans and Lewis sugars in naive BALB/c spleen and peritoneal exudate cells. *Mol Immunol* 44: 1623-1630.
- Dissanayake S, Shahin A, and Ameen AM 2005. Adjuvant effect of *Taenia crassiceps* glycans against leishmanial antigens in mice infected with *Leishmania mexicana*. *Mol Immunol* 42: 1495-1502.
- dos Santos MS, Vaz Cardoso LP, Nascimento GR, Lino Rde S, Jr., Dorta ML, de Oliveira MA, and Ribeiro-Dias F 2008. *Leishmania major*: recruitment of Gr-1+ cells into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN gamma production. *Exp Parasitol* 119: 403-410.
- Dupasquier M, Stoitzner P, Wan H, Cerqueira D, van Oudenaren A, Voerman JS, Denda-Nagai K, Irimura T, Raes G, Romani N, and Leenen PJ 2006. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. *J Leukoc Biol* 80: 838-849.
- Dyer, N. W., and J. H. Greve. 1998. Severe *Cysticercus longicollis* cysticercosis in a black lemur (*Eulemur macaco macaco*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10: 362–364.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, and Mosser DM 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80: 1298-1307.
- Fitzpatrick JM, Fuentes JM, Chalmers IW, Wynn TA, Modolell M, Hoffmann KF, and Hesse M 2009. *Schistosoma mansoni* arginase shares functional similarities with human orthologs but depends upon disulphide bridges for enzymatic activity. *Int J Parasitol* 39: 267-279.
- Flisser A 1991. Taeniasis-cysticercosis: an introduction. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 Suppl: 233-235.
- Flisser A. 1991. Taeniasis-cysticercosis: an introduction. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 22:233-235.
- Freeman R 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.
- Gause WC, Urban JF, Jr., and Stadecker MJ 2003. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* 24: 269-277.
- Gazi U, and Martinez-Pomares L 2009. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214: 554-561.
- Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, Martins GA, Aliberti JC, and Silva JS 1998. Induction of cell-mediated

- immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res* 31: 89-104.
- Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, and Lauvau G 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86: 398-408.
- Gemmell MA, and Johnstone PD 1983. Efficacy of praziquantel against ovine cysticercosis caused by *Taenia hydatigena*. *Res Vet Sci* 34: 199-204.
- Gemmell, M.A. 1987. A critical approach to the concepts of control and Eradication of echinococcosis/hydatidosis and teniasis/cysticercosis. *Intern J Parasitol*, v.17, n.2, p.465- 472.
- Gemmell, MA. Lawson, JR. 1982. Ovine cysticercosis: an epidemiologia.
- Goerdts S, and Orfanos CE 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10: 137-142.
- Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, and Terrazas LI 2005. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol* 27: 395-405.
- Gomez-Garcia L, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, and Terrazas LI 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res* 99: 440-448.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Harn DA, McDonald J, Atochina O, and Da'dara AA 2009. Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunol Rev* 230: 247-257.
- Heldwein K, Biedermann HG, Hamperl WD, Bretzel G, Loscher T, Laregina D, Frosch M, Buttner DW, and Tappe D 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg* 75: 108-111.
- Huggins, D. 1989. Teniasis. **Pediatr Moderna**, v.24, n.6, p.251-256.
- Ichii S, Imai Y, and Irimura T 2000. Initial steps in lymph node metastasis formation in an experimental system: possible involvement of recognition by macrophage C-type lectins. *Cancer Immunol Immunother* 49: 1-9.
- Jackson F 2008. Nutrition and immunity of nematodes of livestock. *Parasite Immunol* 30: 61-62.
- Jankovic D, Sher A, and Yap G 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol* 13: 403-409.
- Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, Hunter CA, and Pearce EJ 2004. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 173: 7454-7461.
- Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, DesJardin LE, and Schlesinger LS 2005. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 202: 987-999.
- Laclette JP, Merchant MT, Damian RT, and Willms K 1990. Crystals of virus-like particles in the metacestodes of *Taenia solium* and *T. crassiceps*. *J Invertebr Pathol* 56: 215-221.
- Lawson, R. 1982. Dispersal of taeniid eggs by blowflies. **New Zealand J Zool**, v.9, n.1, p.46-47.
- Lee SJ, Zheng NY, Clavijo M, and Nussenzweig MC 2003. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* 71: 437-445.

- Locksley RM 1994. Th2 cells: help for helminths. *J Exp Med* 179: 1405-1407.
- Loos-Frank B., Zeyhle E. 1982. The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in Southwest Germany. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 67, 99–113.
- Lopez-Briones S, Sciutto E, Ventura JL, Zentella A, and Fragoso G 2003. CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 90: 157-163.
- Louis CA, Mody V, Henry WL, Jr., Reichner JS, and Albina JE 1999. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 276: R237-242.
- Loukas A, and Maizels RM 2000. Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol Today* 16: 333-339.
- Loukas A, and Prociv P 2001. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev* 14: 689-703, table of contents.
- Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, and Celerier P 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *Aids* 12: 1551-1552.
- Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, and Wynn TA 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 206: 2059-2066.
- Marsland BJ, Kurrer M, Reissmann R, Harris NL, and Kopf M 2008. *Nippostrongylus brasiliensis* infection leads to the development of emphysema associated with the induction of alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 38: 479-488.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, and Eichmann K 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25: 1101-1104.
- Mooney KA, Spolski RJ, See EJ, and Kuhn RE 2000. Immune destruction of larval *taenia crassiceps* in mice. *Infect Immun* 68: 2393-2401.
- Mordue DG, and Sibley LD 2003. A novel population of Gr-1+ activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol* 74: 1015-1025.
- Munder M 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638-651.
- Munder M, Eichmann K, and Modolell M 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160: 5347-5354.
- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, and Modolell M 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163: 3771-3777.
- Nascimento E 1991. Teníase e Cisticercose. In: D NEVES, (Ed., *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 230-242.
- Nascimento E. Teníase e cisticercose. 1998. In: Neves DP (ed) *Parasitologia humana*. 9ª edição, Atheneu, São Paulo, p. 244-256.
- 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.
- Papadopoulos H., Himonas C., Papazahariadou M., Antonadou-Sotiriadou K. 1997. Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. *Journal of Helminthology*, 71, 227–231.

- Pedretti L, Bedaque EA, Sotelo J, and Del Brutto OH 1999. Cisticercose. In: RF VERONESI, R, (Ed., Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 1332-1347.
- Pedretti L, Bedaque EA, Sotelo J, Del Brutto OH. 1999. Cisticercose. In: Veronesi R, ocaccia R (eds) Tratado de Infectologia, Atheneu, São Paulo, p. 1332-1347.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, and Wynn TA 2009. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5: e1000371.
- Petavy A.F., Deblock S. 1980. Helminths of the common fox (*Vulpes vulpes* L.) from the Massif Central. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 55, 379–391.
- Petavy, A.F., Deblock, S., 1983. Connaissance du foyer auvergnat d'échinococcose alvéolaire. Recherche de l'hôte intermédiaire, description des lésions. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58, 430–453.
- Pfeiffer F., Kuschfeldt S., Stoye M. 1997 b. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the south of Saxony-Anhalt – Part 2: Nematodes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 104, 475–477.
- Poglayen G., Guberti V., Leoni B. 1985. Parassiti presenti in volpi (*Vulpes vulpes*) nella provincia di Forlì. *Parassitologia*, 27, 303–311.
- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJ, De Baetselier P, and Ghassabeh GH 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77: 321-327.
- Referência:
- 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* 9: 1115-1127.
- Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, Mattei V, Teggi A, Sorice M, and Siracusano A 2007. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75: 1667-1678.
- Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, and White AC, Jr. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65: 2925-2931.
- 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.
- Rodriguez-Sosa M, Rivera-Montoya I, Espinoza A, Romero-Grijalva M, Lopez-Flores R, Gonzalez J, and Terrazas LI 2006. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol* 242: 61-71.
- 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.
- Shimalov VV, and Shimalov VT 2003. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res* 89: 77-78.

- Sotelo, J. Rosas, N., Palencia, G. 1986. Freezing of infested pork muscle kills cysticerci. *J Am Med Assoc*, v.256, n.7, p.893-894.
- 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.
- Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, and Cerban FM 2010. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol* 2010: 683485.
- Syme RM, Spurrell JC, Amankwah EK, Green FH, and Mody CH 2002. Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc $\gamma$  receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infect Immun* 70: 5972-5981.
- Terrazas LI 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.
- 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.
- Terrazas LI, Bojalil R, Rodriguez-Sosa M, Govezensky T, and Larralde C 1999. *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitol Res* 85: 1025-1031.
- Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, and Harn DA, Jr. 2001. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 167: 5294-5303.
- Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, Ricklefs SM, Porcella SF, Li L, Ellies LG, and Wynn TA 2008. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog* 4: e1000023.
- 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.
- 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.
- van Die, I.; Cummings, R. D., van Tetering, A.; Hokke C. H.; Koeleman, C. A.; van den Eijnden D. H. 2000. Identification of a novel UDPGlc:GlcNAc beta1-4-glucosyltransferase in *Lymnaea stagnalis* that may be involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, v. 10, p. 263-271.
- van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, van Kooyk Y, and van Die I 2007. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 44: 2605-2615.
- van Vliet SJ, Saeland E, and van Kooyk Y 2008. Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol* 29: 83-90.
- van Vliet SJ, van Liempt E, Saeland E, Aarnoudse CA, Appelmelk B, Irimura T, Geijtenbeek TB, Blijt O, Alvarez R, van Die I, and van Kooyk Y 2005. Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in

- the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int Immunol* 17: 661-669.
- Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, and Ferreira AW 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 354-357.
- Vinaud et al., 2007 M.C. Vinaud, R.S. Lino Junior and J.C.B. Bezerra, *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci, *Experimental Parasitology* 116 (2007), pp. 335–339. [Article](#) |  [PDF \(439 K\)](#) | [View Record in Scopus](#) | [Cited By in Scopus \(2\)](#)
- Vinaud MC, Ferreira CS, Lino Junior Rde S, and Bezerra JC 2008. *Taenia crassiceps*: energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Exp Parasitol* 120: 221-226.
- Warnken M, Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, and Racke K 2010. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.
- Wessbecher H., Dalchow W., Stoye M. 1994a. The helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the German Federal Administrative area of Karlsruhe – Part 1: Cestodes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 101, 322–326.
- Wessbecher H., Dalchow W., Stoye M. 1994b. The helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the German Federal Administrative area of Karlsruhe – Part 2: Nematodes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 101, 362–364.
- White AC, Jr. 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med* 51: 187-206.
- Wilson MS, and Wynn TA 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2: 103-121.
- Wunschmann A, Garlie V, Averbeck G, Kurtz H, and Hoberg EP 2003. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *J Vet Diagn Invest* 15: 484-488.
- Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacin M, Modolell M, Lloberas J, and Celada A 2006. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J Immunol* 176: 5918-5924.



## **Manuscrito 2**

Segundo as normas da Revista do Instituto Oswaldo Cruz, exceto os gráficos e legendas que foram adicionados após os resultados para facilitar a leitura da dissertação.

**Running Title:** Colágeno e arginase na cisticercose

**Título:** Inibição da enzima arginase diminui a deposição de colágeno no sítio da infecção por *Taenia crassiceps* sem interferir no desenvolvimento da doença.

**Vânia Beatriz Lopes Moura, Lucas Ferreira Batista, Mayara Miranda e Silva, Ruy de Souza Lino Junior, Milton Adriano Pelli de Oliveira.**

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

Autor para correspondência: Milton Adriano Pelli de Oliveira: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil. FAX: (55) 62 35211839, Phone (55) 62 32096126. E-mail: mapoliv@usp.br

**Palavras Chaves:** *Taenia crassiceps*, cisticercose, macrófago alternativamente ativado, colágeno

Suporte Financeiro: FAPEG, CNPq, CAPES, FUNAPE.

**Título: Inibição da arginase diminui deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados com cisticercos de *T. crassiceps* sem alterar o perfil da infecção.**

**Moura V. B. L.; Silva, M. M. Batista, L. F.; Lino Júnior, R. S.; Oliveira, M. A. P.**

### **Resumo**

A cisticercose caracteriza-se pela presença de cisticercos que podem se alojar em diversos tecidos, os quais são contidos em um granuloma. Citocinas do Perfil Th1 e Th2 e diferentes subpopulações de macrófagos participam do controle do parasito e da formação da fibrose ao redor do mesmo. Macrófagos classicamente ativados utilizam a L-arginina para produzir óxido nítrico e matar os parasitos, enquanto macrófagos alternativamente ativados e fibroblastos expressam a arginase que utilizam a L-arginina para produzir ornitina que favorece a proliferação celular, síntese de colágeno e fibrose. Para avaliar se o bloqueio da arginase interfere na susceptibilidade de camundongos à infecção por cisticercos de *T. crassiceps*, os animais foram infectados e tratados com nor-NOHA por 56 dias. O peso dos animais, número de cisticercos e perfil de células no sítio da infecção não alterou, porém a deposição do colágeno no sítio da infecção foi inibida pelo tratamento com o inibidor de arginase. Estes dados sugerem que a arginase tem pouca importância na susceptibilidade de camundongos à cisticercose, porém, bloqueadores desta enzima podem ser utilizados para minimizar as lesões fibróticas que ocorrem na cisticercose.

## Introdução

A cisticercose caracteriza-se pela presença de larvas de cestodes da família Taeniidae nos tecidos do hospedeiro (Flisser 1991, Nascimento 1991, Pedretti et al. 1999). Os cisticercos podem se alojar em diversos tecidos e infectam mais de dois bilhões de pessoas no mundo, constituindo uma enfermidade com uma grande importância na saúde pública (Maizels and Yazdanbakhsh 2003, Reyes et al. 2009). Ao redor do parasito observa-se a formação de um granuloma que ocorre sob a influência de citocinas associadas aos perfis Th1 e Th2 dos linfócitos e participam diferentes subpopulações de macrófagos, que também são responsáveis pela eliminação dos parasitos (Robinson et al. 1997, Terrazas 2008).

A infecção de camundongos BALB/c por *T. crassiceps* é um importante modelo experimental para o estudo da cisticercose. Neste modelo, camundongos são injetados com cisticercos na cavidade peritoneal e diversas células do sistema imune, incluindo monócitos e macrófagos, são recrutadas para o sítio da infecção. Durante a infecção, estas células sofrem alterações em seus perfis, coordenando o combate ao parasito e a formação do granuloma (Robinson et al. 1997, Terrazas 2008). Numa fase inicial desta infecção, os macrófagos obtidos do sítio infectado são capazes de produzir IL-12 e NO após o estímulo com constituintes de patógenos, sendo associados ao perfil de macrófagos classicamente ativados (CM $\emptyset$ ) (Rodríguez-Sosa et al. 2004). A geração de CM $\emptyset$  é dependente da produção de citocinas do perfil Th1 como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  que induzem um aumento na expressão da enzima iNOS. Esta enzima utiliza a L-arginina para produção de citrulina e NO, sendo que esta última molécula é altamente tóxica e microbicida (Martinez et al. 2009). Nas fases mais tardias desta infecção, os macrófagos do sítio infectado não produzem mais NO após o estímulo com constituintes de *T. crassiceps*, mas expressam uma grande quantidade da enzima arginase (Raes et al. 2005, Rodríguez-Sosa et al. 2004). Macrófagos expressando arginase são gerados principalmente pela exposição às citocinas do perfil Th2 como IL-4 e IL-13 e são conhecidos como macrófagos alternativamente ativados (AAM $\phi$ ). A arginase também utiliza o substrato L-arginina, porém produz L-ornitina e uréia. A ornitina pode ser utilizada como substrato para formação de poliaminas, que favorece a proliferação celular e a prolina é um importante aminoácido para a síntese de colágeno (Munder 2009). Baseado nesta dicotomia, diversos trabalhos têm demonstrado uma associação

entre a presença de CM $\phi$  com alta atividade microbicida e AAM $\phi$  com baixa atividade microbicida, intenso reparo tecidual e fibrose (Chang et al. 1998, Kropf et al. 2005, Thompson et al. 2008, Wilson and Wynn 2009). Além disto, como os dois tipos de macrófagos utilizam o mesmo substrato, acredita-se que a presença de um deles pode inibir a ação do outro.

A produção de NO dependente da iNOS dos CM $\phi$  foi associada ao controle de cisticercos da *T. crassiceps*, pois o tratamento com um inibidor da iNOS, o L-NAME, impediu a morte dos cisticercos (Alonso-Trujillo *et al.* 2007). Este dado levanta a hipótese de que a presença de AAM $\phi$  produzindo arginase pode ser prejudicial ao hospedeiro, favorecendo a proliferação dos parasitos.

Além de expressarem a arginase, os AAM $\phi$  também são descritos como células que favorecem a geração do perfil Th2 que por sua vez aumenta a geração de AAM $\phi$ . Citocinas do perfil Th2, destacando-se a IL-13, foram descritas como importantes mediadores da síntese de colágeno em processos fibróticos, principalmente por ativarem a arginase em fibroblastos (Lindemann & Racke 2003). Além disto, os AAM $\phi$  podem também produzir outros mediadores, como TGF $\beta$ , o qual favorece a proliferação de fibroblastos e também ativa a expressão de arginase. Assim, é possível que a arginase produzida por fibroblastos também possa ser capaz de competir pela L-arginina presente no sítio infectado e inibir a produção de NO por CM $\phi$ .

Além de citocinas do perfil Th2, glicoconjugados presentes em cisticercos de *T. crassiceps* são capazes de induzir a geração de AAM $\phi$  independente de IL-4 e IL-13 (Gomez-Garcia *et al.* 2006, Atochina *et al.* 2008). Estes carboidratos podem se ligar a receptores tipo c-lectina, como o CD301, receptor para manose e o receptor DC-SIGN para induzir esta ativação (Van liempt, 2007, van Die & Dummings, 2009). O receptor CD301 pode ser bloqueado pelo anticorpo específico ER-MP23 (Dupasquier et al. 2004), porém, se este bloqueio interfere na geração de AAM $\phi$  ainda não foi esclarecido.

Neste trabalho foi utilizado o inibidor seletivo da arginase, o nor-NOHA e o anticorpo bloqueador de CD301 para avaliar a função da arginase e dos AAM $\phi$  na suscetibilidade dos camundongos à infecção experimental por *T. crassiceps* e para avaliar a deposição de colágeno no sítio da infecção.

## **Materiais e Métodos**

### Animais e Tratamentos

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6 a 12 semanas do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram mantidos em gaiolas 20 X 30 cm, separados em grupos de 5 camundongos por gaiola. A luminosidade foi controlada por foto período de 12 horas. Os animais receberam água esterilizada e acidificada e ração esterilizada (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) fornecidos *ad libitum*.

Os animais foram infectados ou não com 10 cisticercos de *T. crassiceps* viáveis na fase inicial retirados da cavidade peritoneal de outros camundongos como descrito no item animais e infecção. Imediatamente após a infecção, os camundongos foram tratados intraperitonealmente ou não cinco vezes por semana com PBS, IgG de rato total (100 µg/camundongo), IgG de rato anti-CD301 (100 µg/camundongo), inibidor de arginase (400 µg/camundongo) nor-NOHA (de *N<sup>ω</sup>*- hydroxy-nor-L-arginine/ nor-NOHA, BACHEM, USA), L-arginina (8mg/camundongo) (SIGMA). Após 56 dias de experimento os animais foram eutanasiados por decapitação para obtenção do sangue. As células e os cisticercos da cavidade peritoneal foram obtidos por lavagem peritoneal com solução salina tamponada (PBS). Os procedimentos deste projeto foram avaliados e aprovados pelo comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás sob o protocolo 030/2008.

### Cultivo e manutenção da cepa ORF

Os camundongos foram infectados com a forma larvária inicial de *T. crassiceps*, pertencentes à cepa ORF e mantidas no Biotério do IPTSP-UFG. A manutenção da cepa foi feito por passagens intraperitoneais sucessivas, a cada 90 dias, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade de acordo com Vaz et al (1997). Os animais controles foram inoculados com PBS.

### Pesagens dos animais

Os animais do grupo infectado ou controle foram pesados semanalmente em balança eletrônica de precisão (Bioprecisa BS3000A, série 09245) 0,1g.

### Obtenção e quantificações dos cisticercos

Após a eutanásia dos camundongos foi feito um lavado peritoneal utilizando 3 mL PBS estéril que foram colocados em tubos de polipropileno de 15 ml. A suspensão contendo células e cisticercos ficaram em repouso por 2 min para sedimentação dos cisticercos e coleta do sobrenadante contendo as células. Os cisticercos foram separados e diferenciados segundo (Vinaud et al. 2008) para posterior quantificação.

### Cultura de células peritoneais

O lavado peritoneal contendo as células foi centrifugado a 300x g, durante 10 minutos a uma temperatura de 10°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado com 1 ml de PBS. Para quantificação das células foi realizada uma diluição de 1:10 em azul de tripan e contagem em hematocítômetro. A concentração final de células ajustada para  $2 \times 10^6$ /mL em PBS. Uma quantidade de  $2 \times 10^5$  células foi centrifugada em citocentrífuga (FANEM) para se obter as amostras para confecção das lâminas para contagem diferencial das células. Essas lâminas foram fixadas com metanol, e coradas pela panótico (NEWPROV, Pinhais, PR, Brazil) e montadas com entellan (MERK).

Uma quantidade de  $1,5 \times 10^6$  células/500µl em placa de cultura de tecido de 24 poços (Corning). A incubação foi feita por 48 horas meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de SBF, 2µM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µM de 2-mercaptoetanol a 36°C, em 5% de CO<sub>2</sub>.

### Dosagem de óxido nítrico (NO).

Após 48 horas de incubação, o sobrenadante de cultura das células foi removido para quantificação do nitrito pelo método colorimétrico de Griess (Green et al, 1982) por comparação com uma curva padrão de NaNO<sub>3</sub> começando 100 µm. A revelação foi feita através da adição de solução de Griess (1:1) contendo 50 µl sulfanilamida a 1% e 50 µl N-naftil-etilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%. Após dez minutos à temperatura ambiente, foi feita a leitura utilizando-se leitor ELISA com um filtro de 550 nanômetros.

### Avaliação da atividade de Arginase

As células obtidas como descrito anteriormente foram alicotadas em microtubos contendo  $1 \times 10^6$  células em solução de PBS e lisadas com 5  $\mu$ l de 0,1% Triton X-100. Após 30 min de incubação foram adicionados 100  $\mu$ l de 25 mM Tris-HCl (pH 7.2) e 20  $\mu$ l de 10 mM  $MnCl_2$  para a ativação da enzima pela incubação a 56°C por 10 min. A hidrólise da L-arginina foi conduzida pela incubação de 100  $\mu$ l desse lisado com 100  $\mu$ l de 0,5 M de L-arginina (pH 9.7) a 37°C por 60 min. A etapa seguinte foi realizada em placa de 96 poços de fundo U (Corning, New York 14831, USA) para detecção da uréia e por comparação com uma curva padrão começando 80mg/dl contendo diluições seriadas em duplicatas de 200  $\mu$ l em placa de 96 poços (Corning). Nesta etapa a uréia foi avaliada utilizando 5  $\mu$ l da amostra pelo Kit UREA 500 (Doles, Goiânia, GO, Brasil) segundo instrução do fabricante. A densidade óptica (D.O.) foi detectada por leitor de ELISA com um filtro de 620 nanômetros. Os resultados foram expressos como atividade da enzima em unidades. Uma unidade (U) foi definida como quantidade de uréia/dL produzida por  $2,5 \times 10^4$  células por hora.

### Anticorpos

Os hibridoma RB6-8C6 (anti Ly6C/G) foi doado pela pela Dr<sup>a</sup> Glória Maria Collet de Araújo Lima (UFG). O hibridoma ER-MP23 (anti-CD301-receptor para N-acetil galactosamina) foi doado pelo Dr. Pieter Leenen (Universidade de Erasmus de Rotterdam, Rotterdam, Holanda). IgG totais de rato (controle) foram purificados em coluna de proteína G de soro de rato Wistar e os demais anticorpos purificados a partir de sobrenadante de cultura dos hibridomas.

### Imunocitoquímica para detecção de células CD 301+

Para análise dos marcadores de superfície  $2 \times 10^5$  células obtidas como descrito anteriormente foram depositadas em lâminas para microscopia centrifugado 300 x g durante 10 minutos a uma temperatura de 10°C em citocentrífuga (FANEM). As amostras em lâminas foram e armazenadas -20°C até a realização dos exames. Após o descongelamento das lâminas, foi feito o bloqueio com (PBS contendo 5% SFB) por 20 min a temperatura ambiente (TA). Após esse período, foi feito a lavagem com PBS-

tween e adicionou-se 80 µL de solução de anticorpo purificados na concentração de 1 µg/mL em solução de bloqueio. O anticorpo IgG total de rato foi usado como controle negativo na concentração de 1 µg/mL em solução de bloqueio. Após incubação por 1 h, em câmara úmida, a 4°C, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS-tween e adicionou a solução de anticorpos anti-IgG biotilado (Amersham Pharmacia) na concentração de 1:500 diluídas em solução bloqueio e incubadas por 40 min em câmara úmida. Após incubação, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS-tween secadas cuidadosamente e foram adicionados 100 µl do conjugado extravidina® - peroxidase (SIGMA) na concentração de 1:500 em solução de bloqueio, incubadas entre 4° a 8°C em câmara úmida por 40 min. As lâminas foram lavadas por dez vezes com PBS-tween 20 e adicionou-se a solução do substrato (17,5ml de PBS contendo 2,5 mg diaminobenzidine – DAB, Sigma) mais 5 µL de peróxido de hidrogênio 30%.

A reação foi parada com água destilada e a contra-coloração com verde metila (Amersham Pharmacia. Todas as lâminas foram analisadas sob microscopia de luz utilizando aumento de 10x, 40x e 100x e a frequência de células positivas foi determinada contando-se 1000 células.

#### Avaliação da deposição de colágeno no peritônio

A membrana peritoneal de animais infectados ou não infectados foi coletada e fixada em formalina tamponada a 10%. O material foi processado pelo método de inclusão em parafina. As lâminas foram coradas pelo picro-sirus e examinada em microscopia sob luz polarizada com objetiva de 40x. O colágeno foi quantificado por toda a extensão da membrana peritoneal após a fotografia de 30 campos por animal que foram analisados no programa Image J (NIH).

#### Análise Estatística

Para a análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. Em seguida, as variáveis foram testadas utilizando o programa *Prisma 4.0* utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido o teste de Dunns. Foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Inibição da arginase ou aumento de L-arginina não altera o curso da infecção experimental por cisticercos de *T. crassiceps*.

Cisticercos de *T. crassiceps* proliferam por brotamento na cavidade peritoneal de camundongos BALB/. A proliferação dos cisticercos, a migração de células e o aumento de fluidos na cavidade peritoneal proporcionam um aumento no peso dos animais infectados. O tratamento com inibidor da enzima arginase ou o fornecimento do substrato para a arginase (L-arginina) não altera a curva ponderal dos animais infectados (FIGURA 1A). O inibidor de arginase e a L-arginina também não altera o peso dos animais não infectados (FIGURA 1B), sugerindo que estes compostos, não alteraram a proliferação dos cisticercos e a entrada de fluidos na cavidade peritoneal, tanto em animais infectados quanto não infectados. A confirmação de que o inibidor de arginase e a L-arginina não interfere na proliferação dos cisticercos pode ser observada na FIGURA 2, a qual mostra que além do número total de parasitos permanecer constante, os cisticercos nos diferentes estádios de evolução também não sofrem alterações significativas quando a arginase é bloqueada ou quando há um aumento do substrato para a enzima.

O perfil das células presentes no sítio da infecção por cisticercos de *T. crassiceps* não sofre alterações pela inibição da arginase ou aumento da disponibilidade de L-arginina.

Macrófagos alternativamente ativados em um sítio infectado podem ser marcados pelo anticorpo monoclonal anti-CD301. Para observar se o bloqueio da arginase ou aumento da disponibilidade do substrato para a arginase interfere no perfil das células que infiltram a cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps*, as células peritoneais dos camundongos infectados foram analisadas para expressão de CD301 após o tratamento com nor-NOHA, L-arginina ou PBS. A porcentagem de células CD301+ não sofreu nenhuma alteração significativa após o tratamento com nor-NOHA, porém, aumentaram após o tratamento com L-arginina, sugerindo que a L-arginina pode aumentar a expressão de CD301 em macrófagos ou

umentar a geração dos AAM $\phi$ . (Figura 3 A e B). As características funcionais das células, entretanto, não foram alteradas pelo tratamento com o inibidor reversível da arginase o nor-NOHA, já que a atividade desta enzima em células obtidas de camundongos que foram tratados por 56 dias com este inibidor permaneceu inalterada (Figura 4 B). A adição do inibidor de arginase durante o ensaio para dosagem da atividade da enzima *in vitro* revelou que este inibidor inibiu a síntese de uréia (dados não mostrados), indicando que ele é capaz de inibir a atividade da arginase. Como o inibidor é reversível e as células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos foram lavadas com PBS antes de serem submetidas ao estudo da atividade da arginase, a manutenção da atividade da enzima em valores semelhantes àquela observada nos animais não tratados sugere que o bloqueio da enzima não induziu nenhum mecanismo de regulação para promover alteração na síntese da arginase. Aparentemente, outra enzima que utiliza a L-arginina como substrato, a iNOS, também não se alterou com o tratamento dos animais com L-arginina ou nor-NOHA, já que o NO produzido pelas células peritoneais em cultura permaneceu baixo e sem diferenças após os tratamentos (FIGURA 4 A).

Inibição da arginase diminui deposição de colágeno no peritônio de camundongos infectados com cisticercos de *T. crassiceps*

A arginase é importante para síntese de prolina, o principal aminoácido presente no colágeno. Como em uma infecção crônica por cisticercos observa-se a formação de um granuloma contendo grande quantidade de colágeno, foi avaliado se há alguma interferência na deposição do colágeno no peritônio após o aumento da disponibilidade de L-arginina ou após a inibição da arginase em camundongos infectados. Embora o tratamento com L-arginina não tenha sido capaz de alterar a deposição de colágeno na cavidade peritoneal, a inibição da enzima arginase foi capaz de diminuir significativamente a fibrose local (FIGURA 5). Este dado confirma que a atividade da arginase foi significativamente bloqueada pelo inibidor nor-NOHA neste trabalho, embora a inibição não tenha interferido no número de parasitos e no perfil do infiltrado celular como demonstrado anteriormente. A deposição de colágeno no peritônio de animais não infectados não se alterou com o bloqueio da enzima arginase, sugerindo que a dose do inibidor utilizada não interferiu nas funções fisiológicas da enzima. A confirmação de que a dose utilizada não foi tóxica foi obtida pela análise histológica do

fígado de animais infectados ou não infectados, os quais estavam semelhantes aos fígados dos respectivos animais controles (dados não mostrados).

Bloqueio do receptor para galactose (CD301) não altera o perfil da infecção por cisticercos de *T. crassiceps*

A enzima arginase I, que favorece a síntese de prolina e o aumento na produção de colágeno, é encontrada principalmente em macrófagos e em fibroblastos nos tecidos inflamados. Os macrófagos que possuem grande atividade da enzima arginase são conhecidos como AAM $\phi$ , os quais expressam grande quantidade do receptor para N-acetil-galactosamina/ CD301. Estes receptores podem ser bloqueados pelo anticorpo monoclonal ER-MP23. Como carboidratos na superfície da *T. crassiceps* são indutores de AAM $\phi$  expressando uma grande atividade da arginase, foi investigado neste trabalho se o bloqueio de um dos receptores para carboidratos dos macrófagos, o CD301, poderia interferir na geração de AAM $\phi$  ou com a atividade da arginase nestas células. Como pode ser visto na FIGURA 6, o tratamento com anti-CD301 não interferiu no desenvolvimento da cisticercose experimental, pois o peso dos animais infectados não alterou após o tratamento (Figura 6A). Além disto, o número de cisticercos nas diferentes fases também não foi alterado pelo tratamento com anti-CD301, embora a presença de anticorpos irrelevantes (IgG de Rato) tenha induzido um aumento no número de cisticercos na fase inicial (Figura 6B). A presença destes anticorpos não alterou a expressão de CD301 nas células presentes no infiltrado inflamatório, nem alterou a atividade da enzima arginase (Figuras 6 C, D). Estes dados sugerem que macrófagos alternativamente ativados são gerados independentes da ligação de carboidratos ao receptor CD301 e o bloqueio deste receptor não interfere na progressão da cisticercose experimental.

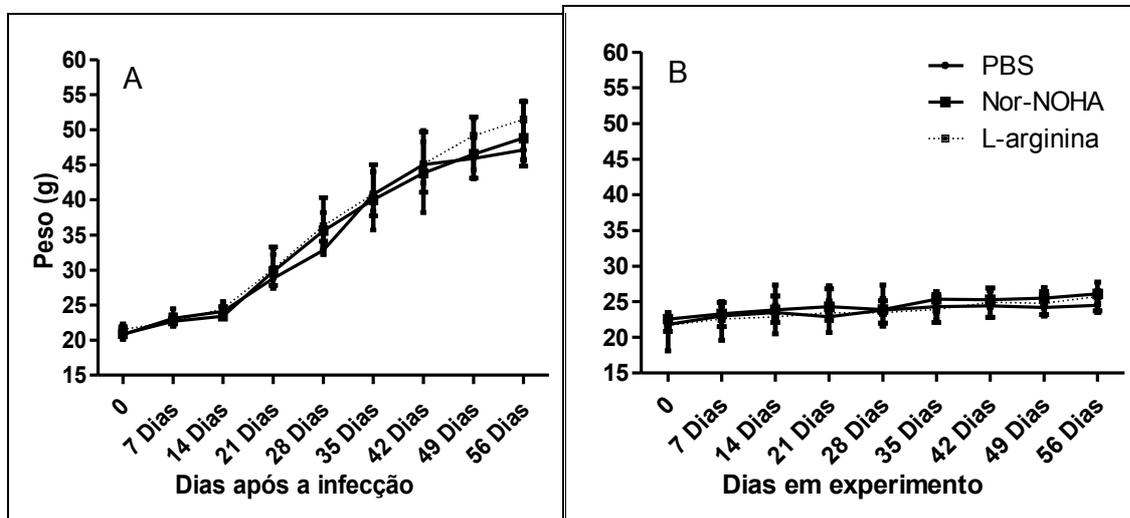


Figura 1- Análise ponderal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com de nor-NOHA ou L-arginina. Camundongos BALB/c foram infectados (A) ou não (B) com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com nor-NOHA (400 µg /camundongo) ou L-arginina (8 mg/camundongo). Os animais foram pesados semanalmente até 56 dias. As curvas representam a média ±SD do peso de 3 animais.

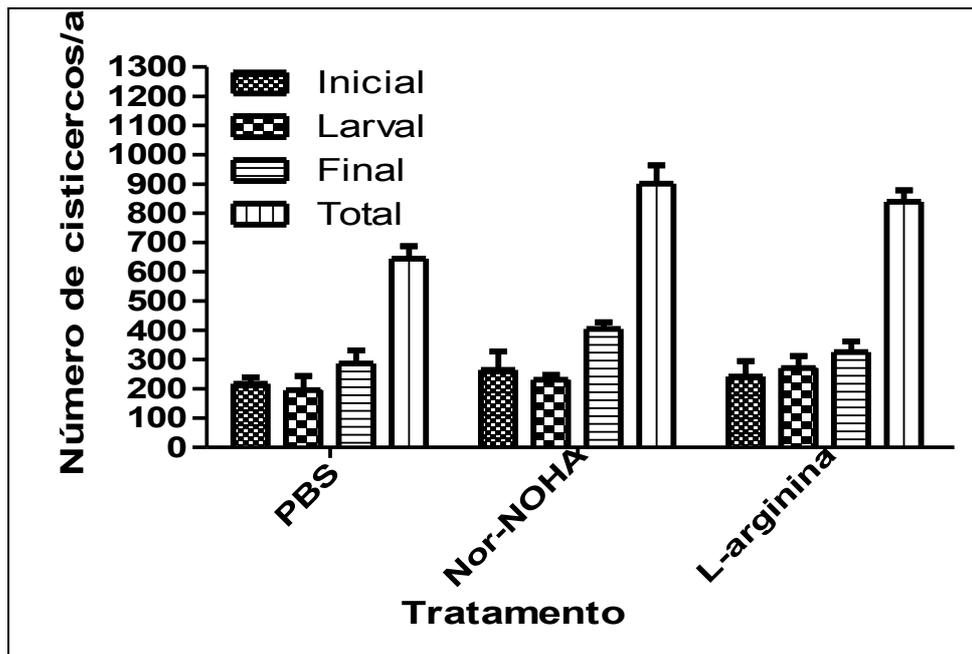


Figura 2- Número de cisticercos recuperados da cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com nor-NOHA (400  $\mu$ g /camundongo) ou L-arginina (8 mg/camundongo). Os animais foram eutanasiados ao 56º dia após a infecção e os cisticercos recuperados da cavidade peritoneal foram quantificados de acordo com a sua fase de desenvolvimento. As barras representam a média  $\pm$ SD do número de cisticercos de 3 animais.

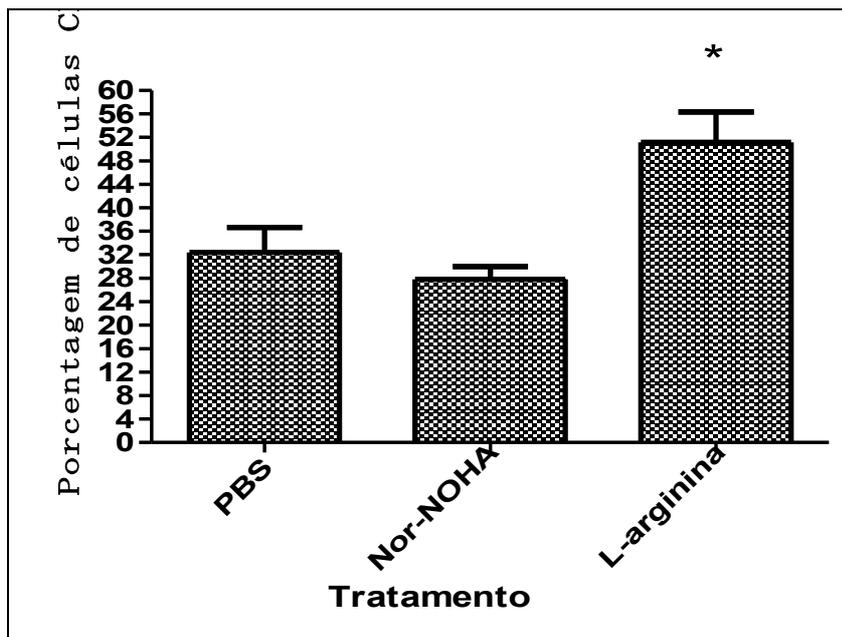


Figura 3-

Porcentagem de células CD301+ na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com PBS, nor-NOHA (400 µg /camundongo) ou L-arginina (8 mg/camundongo). Os animais foram eutanasiados ao 56º dia após a infecção e as células na cavidade peritoneal foram colhidas e marcadas por imunocitoquímica para CD301. A porcentagem de células positivas foi avaliada em microscopia de luz. As barras representam a média ±SD da porcentagem de células presentes na cavidade peritoneal de 2 (PBS) ou 3 animais (Nor-NOHA e L-arginina).

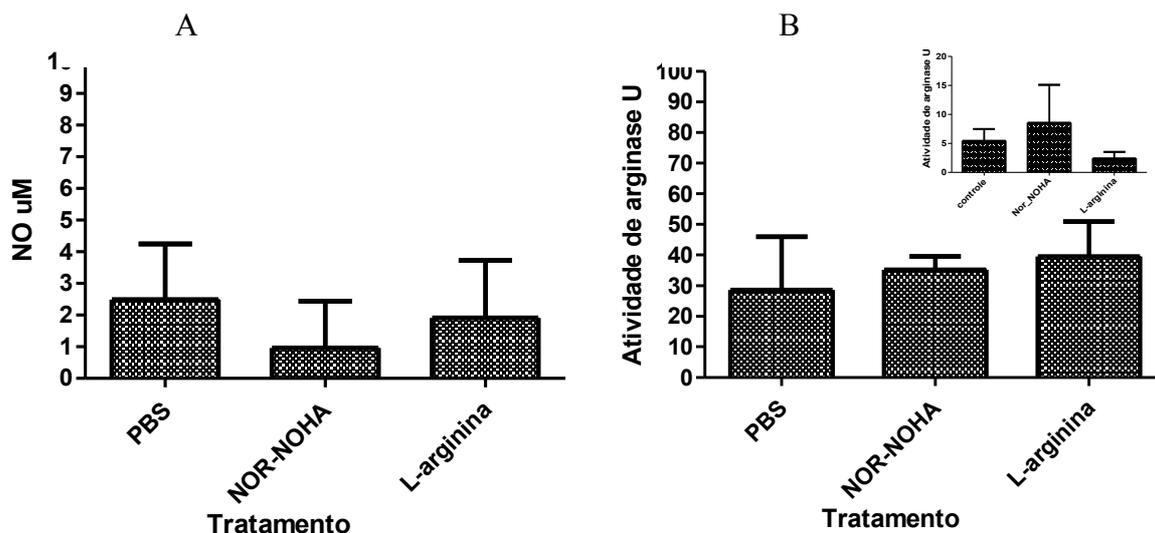


Figura 4- Produção de óxido nítrico (A) e atividade de arginase (B) de células na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com PBS ou nor-NOHA (400  $\mu$ g /camundongo) ou L-arginina (8 mg/camundongo). Os animais foram eutanasiados ao 56º dia após a infecção e as células na cavidade peritoneal foram colhidas para avaliação da produção de NO ou atividade de arginase. As barras representam a média  $\pm$ SD da porcentagem de células presentes na cavidade peritoneal de 3 animais. O inserto representa a atividade da arginase das células obtidas da cavidade peritoneal de camundongos tratados com nor-NOHA ou L-arginina, mas não infectados.

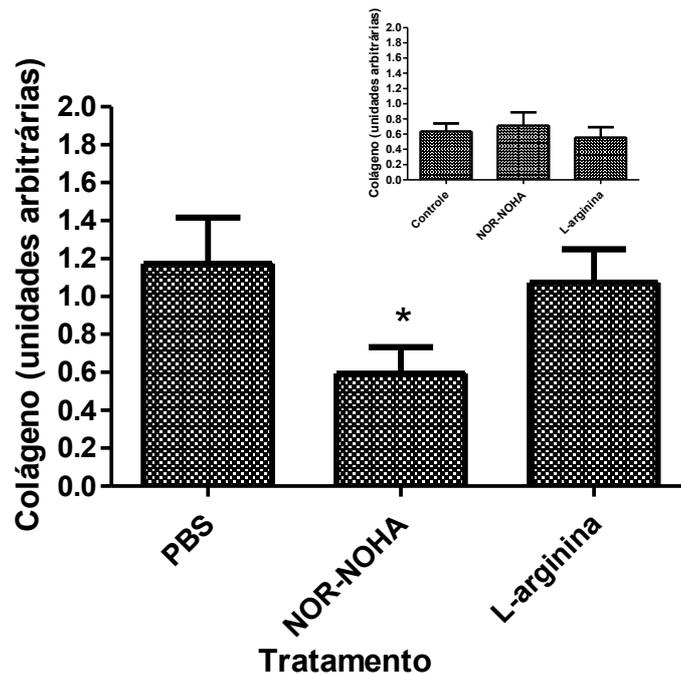


Figura 5- Deposição de colágeno sobre o peritônio de camundongos infectados com *T. crassiceps* e tratados com nor-NOHA ou L-arginina. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com PBS ou nor-NOHA (400  $\mu$ g /camundongo) ou L-arginina (8 mg/camundongo). Os animais foram eutanasiados ao 56º dia após a infecção e o peritônio foi processado em parafina para preparação de lâminas coradas com picrossírius. As barras representam a média  $\pm$ SD da porcentagem de células presentes na cavidade peritoneal de 3 animais. \* indica diferença estatística do grupo de animais tratados com PBS. ( $P < 0,05$ ). O inserto representa o colágeno depositado no peritônio de camundongos tratados com nor-NOHA ou L-arginina, mas não infectados.

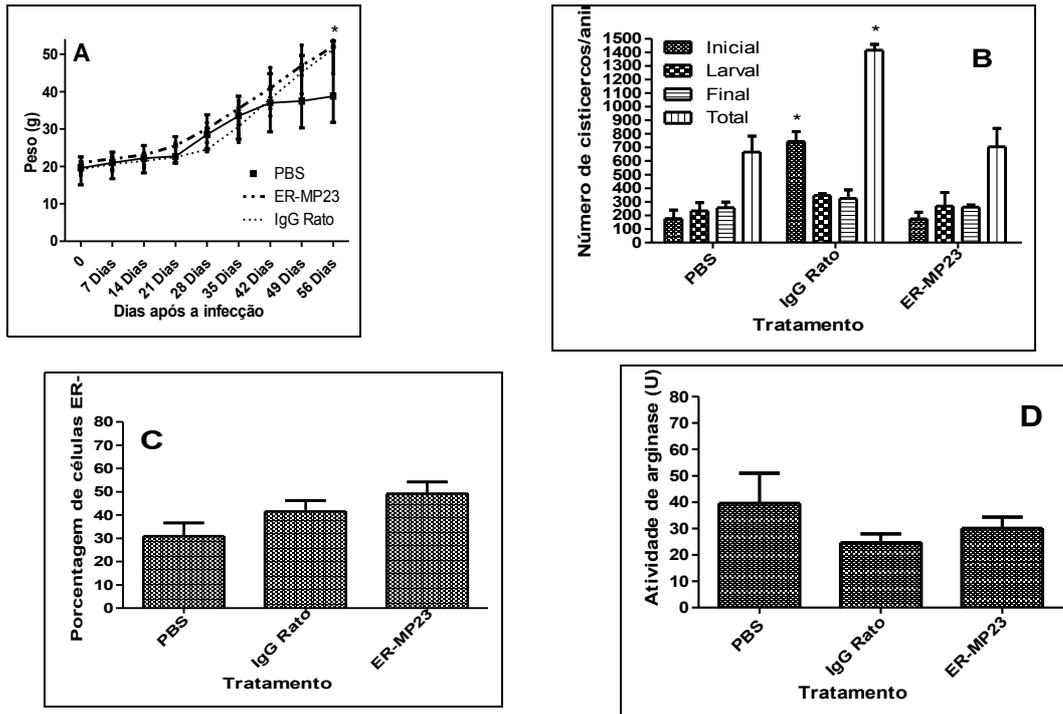


Figura 6- Tratamento com anticorpo anti-CD301 não altera o curso da cisticercose experimental. Camundongos BALB/c foram infectados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* na fase inicial IP e tratados 5 vezes por semana com PBS, 100  $\mu$ g/camundongo de IgG de Rato inespecífica ou IgG de rato anti-CD301. O peso dos animais foi avaliado semanalmente (A). Os animais foram eutanasiados ao 56º dia após a infecção e as células na cavidade peritoneal e os cisticercos foram colhidos para avaliação do número e estágios dos cisticercos (B), porcentagem de células ER-MP23+ (C) e atividade de arginase (D). \* indica diferença do grupo de animais tratados com PBS. ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

A arginase é uma enzima encontrada em duas isoformas em mamíferos e hidrolisa a L-arginina para geração de L-ornitina e uréia. A arginase I é expressa principalmente no fígado, onde participa do ciclo da uréia que é um importante mecanismo fisiológico de eliminação de amônia em mamíferos (Munder 2009). A arginase II é uma proteína mitocondrial expressa em vários tecidos, como rim, próstata, intestino delgado e glândulas mamárias. Nestes tecidos, ela é importante em diversas funções fisiológicas como a geração de poliaminas para proliferação celular e transporte através das membranas (Munder 2009). Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos também são capazes de expressar a arginase I, principalmente após a ativação com citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-13 (Warnken *et al.* 2010, Maizels *et al.* 2009, Munder 2009). A arginase de AAM $\phi$  compete pelo substrato L-arginina com a iNOs, inibindo a síntese de NO e a capacidade microbicida dos CM $\phi$ . Os resultados deste trabalho demonstram que a inibição da arginase ou a suplementação de L-arginina não altera o perfil da infecção experimental por cisticercos de *T. crassiceps*. Tanto o número total quanto os cisticercos nas diferentes fases de evolução permaneceram inalterados após o tratamento com nor-NOHA ou com L-arginina. Este dado sugere que a L-arginina presente no sítio da infecção encontra-se em excesso para ser utilizada pelos macrófagos para produzirem NO. Este excesso de L-arginina disponível é confirmado pelo fato de que a adição deste aminoácido na cavidade peritoneal também não altera o curso da infecção. Esta falta de competição entre iNOS e arginase pode ser parcialmente explicada pelo fato de que a indução da enzima iNOS, em macrófagos, na infecção por *T. crassiceps* é muito baixa. Assim, uma quantidade pequena de L-arginina disponível seria suficiente para proporcionar uma produção de NO que controla os parasitos. A hipótese de que a indução da iNOS é baixa pode ser comprovada pelo fato de que a produção espontânea de NO por células peritoneais de camundongos infectados é semelhante à dos controles não infectados em todas as fases da infecção (MOURA, 2010, manuscrito em preparação). Vale ressaltar que embora a produção de NO seja baixa, o bloqueio da iNOS é capaz de inibir a morte do cisticercos (Alonso-Trujillo *et al.* 2007).

Além de ser expressa em AAM $\phi$ , a arginase é expressa em várias outras células, as quais utilizam a L-arginina para produção da L-ornitina. Esta última pode ser

metabolizada pela ornitina descarboxilase para gerar poliaminas, como a putrecina, espermina e espermidina, que são metabolizadas em ácidos nucléicos utilizados na proliferação celular (Munder 2009, Pesce *et al.* 2009). A depleção de arginina em um microambiente tem sido relacionada à imunossupressão devido à inibição da proliferação de linfócitos (Modolell *et al.* 2009, Pesce *et al.* 2009, Rodriguez *et al.* 2007). Desta forma, era de se esperar uma menor resposta imune contra os parasitos e, conseqüentemente, um aumento da carga parasitária nos animais tratados com nor-NOHA. Porém, existem relatos de que diversos microorganismos também possuem a enzima arginase, a qual é utilizada para favorecer o crescimento dos patógenos por duas vias: a) produção de poliaminas e b) depleção L-arginina disponível para o hospedeiro produzir NO (Fitzpatrick *et al.* 2009, McGee *et al.* 2004, Viator *et al.* 2008). Como a *T. crassiceps* também é capaz de expressar a arginase (dados não mostrados), é possível que a enzima dos parasitos também seja inibida pelo inibidor da arginase, fazendo com que a ação do nor-NOHA interfira tanto na resposta imune do hospedeiro, quanto na proliferação do parasito, mantendo o perfil final da doença inalterado.

A geração dos AAM $\phi$  é dependente principalmente de citocinas Th2, porém, glicoconjugados de helmintos são capazes de induzir a geração destas células em animais deficientes do receptor para IL-4 e IL-13 (Atochina *et al.* 2008). A ativação de células mielóides por glicoconjugados é mediada por 3 receptores, o receptor para manose, o receptor para galactose (CD301) e o *intracellular adhesion molecule -3 (ICAM-3) grabbing no integrin* (DC-SIGN) (van Liempt *et al.* 2007). Neste estudo, o bloqueio do receptor para galactose não alterou a infecção por cisticercos por *T. crassiceps*, o que corrobora os achados de van Liempt e colaboradores que demonstraram que para inibir a ativação de células dendríticas por carboidratos deve-se bloquear os três receptores e não apenas um deles (van Liempt *et al.* 2007). Embora os AAM $\phi$  sejam geralmente associados com uma atividade anti-microbica, estas células também podem ter ações microbicas, as quais são mediadas pela quitinase que degrada o tegumento de helmintos, ou outros mecanismos ainda não bem esclarecidos (Anthony *et al.* 2007, Maizels *et al.* 2009).

Na cisticercose ocorre a formação de um granuloma, onde citocinas dos perfis Th1 e Th2 podem ser encontradas regulando a sua formação e a ativação dos mecanismos para controle dos parasitos (Robinson *et al.* 1997). A formação do granuloma ao redor do patógeno é importante para que antígenos microbianos não estimulem excessivamente o sistema imune promovendo um aumento da lesão tecidual

(Wynn et al. 2004). Por outro lado, a grande formação da fibrose pode comprometer a função dos órgãos parasitados e ser responsável pela patogênese da doença (Pesce et al. 2009). Desta forma, a deposição de colágeno ao redor do patógeno deve ser controlada para que seja grande o suficiente para conter os antígenos dentro do granuloma, mas o menor possível para impedir comprometimento dos órgãos.

A formação de um tecido fibroso na inflamação crônica parece ser feita principalmente por fibroblastos ativados pelas citocinas TGF- $\beta$  e IL-13, sendo que o papel dos AAM $\phi$  está mais relacionado à inibição da atividade da arginase dos fibroblastos por depleção de L-arginina promovendo inibição da síntese de colágeno (Pesce *et al.* 2009, Wilson & Wynn 2009). Nossos resultados mostraram que embora o inibidor nor-NOHA não tenha interferido na atividade dos AAM $\phi$ , este inibidor foi capaz de diminuir a deposição de colágeno no peritônio dos animais infectados. Vale salientar que a dose de inibidor de arginase utilizada nestes experimentos foi quatro vezes maior do que a dose que induziu um aumento na resistência de camundongos à infecção por *L. major* descrita em outro trabalho (Kropf *et al.* 2005). Este dado sugere que a síntese de colágeno por fibroblastos é altamente sensível ao inibidor nor-NOHA. Esta maior sensibilidade ao inibidor para a síntese de colágeno não é compreendida no momento, porém é possível que os mecanismos de captação do inibidor pelos fibroblastos sejam mais eficientes que dos macrófagos.

Neste trabalho foi demonstrado que a inibição da arginase não altera a proliferação dos cisticercos durante a cisticercose experimental, porém, inibe a deposição de colágeno no sítio da infecção. Desta forma, nossos resultados suportam a idéia de que o uso de um inibidor de arginase juntamente com outros produtos microbicidas pode auxiliar em infecções onde a fibrose tecidual faça parte da patogênese da doença, pois a deposição de colágeno é mais facilmente bloqueada pelo inibidor nor-NOHA que outros processos dependentes da L-arginina.

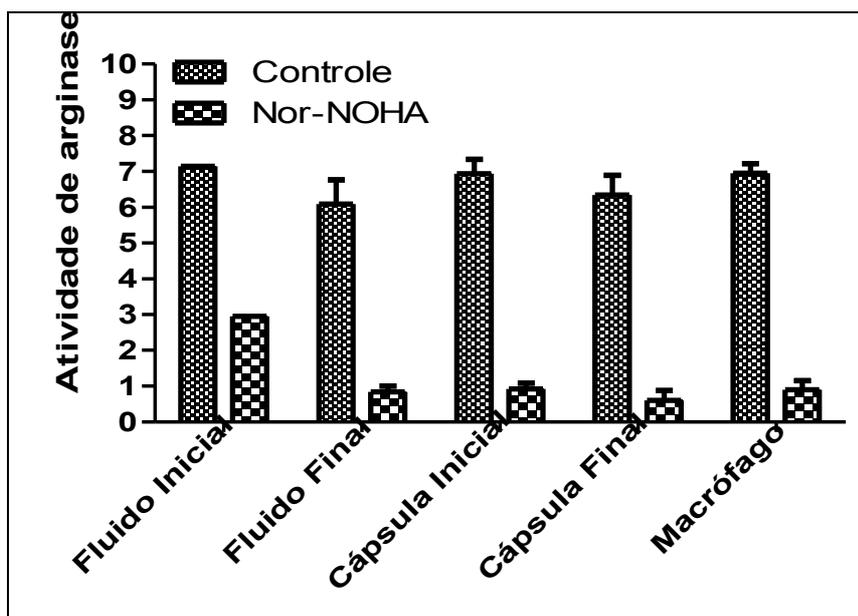
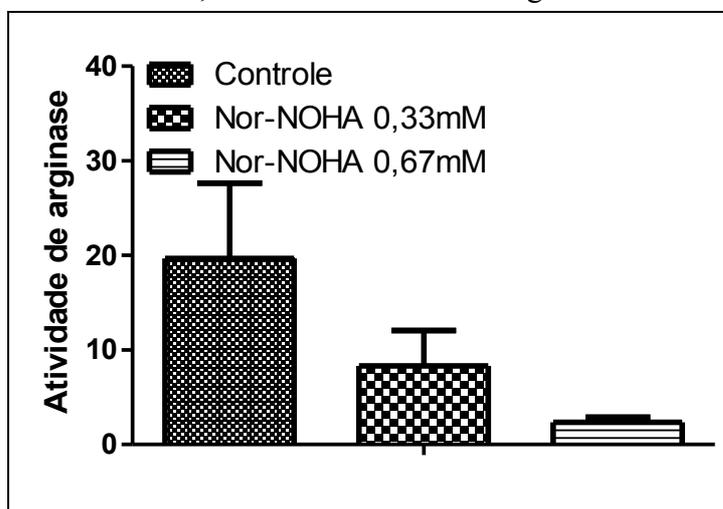


Figura 1 - Inibição atividade

da de arginase pelo inibidor nor-NOHA *in vitro* em cisticercos e macrófagos residentes. Cisticercos nas fases finais ou iniciais foram macerados e o fluido vesicular e as cápsulas coletadas separadas e tratadas com solução de lise (PBS contendo 0,1% de Triton 100). Células residentes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c também foram tratados com solução de lise. A atividade de arginase de cada lisado foi quantificada e a quantidade de lisado contendo 10 U de atividade foi diluída em 50  $\mu$ L de PBS contendo ou não 0,67mM de inibidor de arginase nor-NOHA. A atividade da enzima foi avaliada na presença ou ausência do inibidor. Como mostrado de arginase



significativamente a atividade da enzima do cisticerco e de macrófagos *in vitro*. n=3 experimentos exceto para fluido inicial.

Figura 2 - Inibição da atividade de arginase pelo inibidor nor-NOHA *in vitro* em macrófagos peritoneais de camundongos infectados.  $1 \times 10^6$  células peritoneais de camundongos BALB/c infectados por 21 dias com *T. crassiceps* foram tratados com solução de lise. (PBS contendo 0,1% de Triton 100). A atividade de arginase de cada lisado foi quantificada na presença ou ausência de 0,67mM de inibidor de arginase nor-NOHA. Como pode ser observado, o inibidor de arginase inibiu significativamente a atividade da enzima macrófagos infectados *in vitro*. n=3 experimentos.

## Discussão

A habilidade das infecções helmínticas em regular a resposta imune é observada por décadas. Os helmintos possuem vários carboidratos na superfície, os quais podem ser excretados/secretados exercendo um importante papel na regulação imune, principalmente, favorecendo a instalação do perfil Th2 (Atochina et al. 2001, Gomez-Garcia et al. 2006, Terrazas et al. 2001). Estes carboidratos se ligam a receptores específicos presentes em macrófagos, promovendo a geração dos AAMo. Além dos carboidratos, citocinas do perfil Th2 como IL-4 e IL-13 também favorecem a geração dos AAMo, sendo fundamentais para sustentar sua atividade (Harn I2009).

Macerado dos cisticercos contendo glicoconjugados (Gomez-Garcia et al. 2006) são capazes de induzir respostas proliferativa de células T naive (Rodriguez-Sosa I 2002), migração de células mieloides supressoras (F4/80+Gr1+), expressão de marcadores de AAMo e a produção de citocinas IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  (Gomez-Garcia I 2006, Terrazas 2008, Wilson & Wynn 2009).

A presença de AAMo em infecções helmínticas e, mais particularmente, na cisticercose experimental tem sido associado a um aumento da resposta imune Th2, aumento da proliferação dos parasitos, aumento da fibrose (Terrazas 2008, Wilson and Wynn 2009). No presente trabalho nós observamos que os macrófagos foram as células que predominaram por todo processo experimental, sendo o alvo de nossa investigação através de sua avaliação funcional e fenotípica.

As proteínas expressas por AAMo ajudam no controle da inflamação, como também na expulsão de parasitos que vivem no lúmen intestinal (Maizels et al. 2009). A arginase expressa nestes AAMo ajuda na resposta imune na infecção por *S. mansoni* e inibe o desenvolvimento da doença hepatoesplênica severa. Acredita-se que nesta infecção a arginase dos AAMo é capaz de depletar L-arginina que é requerida para manutenção da proliferação de células T e da resposta Th2. Como a inflamação granulomatosa no fígado e intestino e a fibrose são dependentes da resposta Th2 em camundongos cronicamente infectados, a inibição da proliferação de linfócitos Th2 diminui as lesões patológicas (Pesce et al. 2009). Na esquistossomose murina crônica, o tamanho do granuloma e a fibrose produzida ao redor do ovo são dependentes da presença da cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-4 (Mentink-Kane et al. 2004). Este receptor possui duas cadeias, sendo que uma delas é compartilhada para formar o receptor da IL-13, sendo que camundongos deficientes do receptor da IL-13 ou IL-13R $\alpha$  são

protegidos da fibrose e podem sobreviver por mais tempo quando comparados com camundongos selvagens infectados cronicamente (Chiaramonte et al. 2001, Fallon et al. 2000, Ramalingam et al. 2008). Esses dados indicam que a resposta Th2 com grande quantidade IL-4 e IL-13 são fundamentais para a produção de colágeno e fibrose.

A resposta imune inicial observada na cisticercose experimental é do tipo Th1 que mantém uma baixa carga parasitária e pouca deposição de colágeno local. A resposta do tipo Th2 só foi observada aos 42 dias de infecção, enquanto a resposta Th1 também se manteve alta na fase tardia, mostrando o perfil misto sistêmico da resposta imune. A partir dos 42 dias observamos alterações significantes no perfil da infecção. O número de cisticercos cresceu exponencialmente comparado com a fase inicial da infecção, indicando um pior prognóstico dessa doença. Estes dados sugerem que o aparecimento da resposta Th2 favoreceu a proliferação dos parasitos.

Citocinas do perfil Th2 induzem um aumento da expressão da arginase, a qual tem importância fundamental na patogênese dessa infecção experimental. Para avaliar a importância desta enzima foi utilizado o inibidor competitivo nor-NOHA, como também a suplementação do substrato usado pelas enzimas arginase e iNOS, a L-arginina. Após o tratamento com nor-NOHA não foi observado alterações marcantes entre os grupos nos vários parâmetros analisados a ponto de alterar o curso da infecção. Vale ressaltar que uma quantidade de nor-NOHA quatro vezes menor do que a utilizada neste trabalho inibiu a enzima arginase *in vivo* durante a infecção por *Leishmania major*, o que resultou no controle das lesões e no controle da replicação do parasito (Kropf et al. 2005). É possível que a falta de alterações no desenvolvimento da infecção seja devido a capacidade do inibidor nor-NOHA inibir a arginase tanto do parasito quanto do hospedeiro. No tratamento com L-arginina também não foi observado alterações no curso da infecção, o que pode ser parcialmente explicada pelo fato de que a indução da enzima iNOS, em macrófagos, nesta infecção é muito baixo.

O papel dos AAMo na síntese de colágeno está mais relacionada à inibição da atividade da arginase dos fibroblastos por depleção de L-arginina do que uma ação direta na produção de prolina para sua síntese (Pesce *et al.* 2009, Wilson & Wynn 2009). Os resultados deste trabalho sugerem que a arginase dos fibroblastos sejam altamente sensível ao inibidor nor-NOHA, pois foi observada uma diminuição da deposição do colágeno no peritônio de animais tratados com o inibidor, sem alterações na atividade da arginase dos AAMo ou dos parasitos. Esta maior sensibilidade ao inibidor para a síntese de colágeno nos fibroblastos não está bem compreendida, porém é possível que

os mecanismos de captação do inibidor pelos fibroblastos sejam mais eficientes que dos macrófagos.

Neste trabalho também foi utilizado o anticorpo bloqueador do CD301. Van liempt, 2007 descreveu que para que as células mielóides fossem ativadas por glicoconjugados era preciso a mediação por 3 receptores: o receptor para manose, o receptor para galactose (CD301) e o molécula de adesão intracelular 3 (ICAM-3) relacionada a uma não intergina (DC-SIGN). Como neste trabalho um único receptor foi bloqueado, nenhuma alteração na ativação dos AAMo foi observada, sendo necessário o bloqueio dos três receptores citados acima para uma mudança efetiva no curso da infecção.

## **Conclusões**

Os cisticercos de *T. crassiceps* são capazes de se multiplicar facilmente na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, sendo esta proliferação mais intensa após 30º dia de infecção.

Os cisticercos podem ser classificados em 3 estádios distintos, os quais se mantiveram em número similar por todo período experimental.

A resposta imune inicial é do tipo Th1 e somente aos 42 dias de infecção é observada uma resposta significativa do tipo Th1e Th2 no soro dos camundongos infectados.

Os macrófagos são as células predominantes na cavidade peritoneal desses camundongos, sendo o seu perfil funcional do tipo alternativamente ativado ou supressores observados por toda infecção.

A deposição de colágeno aumenta na peritônio apenas após o 56 dia de infecção.

Não foi observado mudanças no curso da infecção quando camundongos infectados com *T. crassiceps* foram tratados com inibidor de arginase ou com L-arginina.

O inibidor de arginase foi capaz de inibir a deposição de colágeno no peritônio dos animais tratados.

## Referências

- Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, and Terrazas LI 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res* 100: 1341-1350.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, and Gause WC 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7: 975-987.
- Atochina O, Da'dara AA, Walker M, and Harn DA 2008. The immunomodulatory glycan LNFPIII initiates alternative activation of murine macrophages in vivo. *Immunology* 125: 111-121.
- Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D, McGuire E, and Harn DA 2001. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 167: 4293-4302.
- Chang CI, Liao JC, and Kuo L 1998. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274: H342-348.
- Chiaromonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, and Wynn TA 2001. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 34: 273-282.
- Dupasquier M, Stoitzner P, van Oudenaren A, Romani N, and Leenen PJ 2004. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol* 123: 876-879.
- Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, and McKenzie AN 2000. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol* 164: 2585-2591.
- Fitzpatrick JM, Fuentes JM, Chalmers IW, Wynn TA, Modolell M, Hoffmann KF, and Hesse M 2009. *Schistosoma mansoni* arginase shares functional similarities with human orthologs but depends upon disulphide bridges for enzymatic activity. *Int J Parasitol* 39: 267-279.
- Flisser A 1991. Taeniasis-cysticercosis: an introduction. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 Suppl: 233-235.
- Gomez-Garcia L, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, and Terrazas LI 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res* 99: 440-448.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Harn DA, McDonald J, Atochina O, and Da'dara AA 2009. Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunol Rev* 230: 247-257.
- Kropf P, Fuentes JM, Fahrlich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, and Muller I 2005. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* 19: 1000-1002.
- Lee SJ, Zheng NY, Clavijo M, and Nussenzweig MC 2003. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* 71: 437-445.

- Lindemann D, and Racke K 2003. Glucocorticoid inhibition of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) induced up-regulation of arginase in rat airway fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368: 546-550.
- Maizels RM, and Yazdanbakhsh M 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 3: 733-744.
- Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, and Wynn TA 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 206: 2059-2066.
- McGee DJ, Zabaleta J, Viator RJ, Testerman TL, Ochoa AC, and Mendz GL 2004. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily. *Eur J Biochem* 271: 1952-1962.
- Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, Hailu A, Muller I, Rogers ME, Bangham CR, Munder M, and Kropf P 2009. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e480.
- Munder M 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638-651.
- Nascimento E 1991. Teníase e Cisticercose. In: D NEVES, (Ed., Parasitologia Humana. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 230-242.
- Pedretti L, Bedaque EA, Sotelo J, and Del Brutto OH 1999. Cisticercose. In: RF VERONESI, R, (Ed., Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 1332-1347.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, and Wynn TA 2009. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5: e1000371.
- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJ, De Baetselier P, and Ghassabeh GH 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77: 321-327.
- Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Stevens S, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Urban JF, Jr., Donnelly RP, and Wynn TA 2008. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor alpha1 chain. *Nat Immunol* 9: 25-33.
- 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* 9: 1115-1127.
- Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, and White AC, Jr. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65: 2925-2931.
- Rodriguez PC, Quiceno DG, and Ochoa AC 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109: 1568-1573.
- 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.
- Terrazas LI 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.
- Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, and Harn DA, Jr. 2001. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that

- secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 167: 5294-5303.
- Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, Ricklefs SM, Porcella SF, Li L, Ellies LG, and Wynn TA 2008. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog* 4: e1000023.
- van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, van Kooyk Y, and van Die I 2007. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 44: 2605-2615.
- Viator RJ, Rest RF, Hildebrandt E, and McGee DJ 2008. Characterization of Bacillus anthracis arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. *BMC Biochem* 9: 15.
- Warnken M, Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, and Racke K 2010. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.
- Wilson MS, and Wynn TA 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2: 103-121.
- Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, and Mentink-Kane MM 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev* 201: 156-167.

# 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](#)