



Universidade Federal do Acre

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na
Amazônia Ocidental**

MÁBIA DE JESUS LIMA

***CULTIVO IN VIVO DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO
SOBRE A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL***

Orientador: Dr. Nilton Ghiotti de Siqueira

Rio Branco-Ac

03/2020

MÁBIA DE JESUS LIMA

***CULTIVO IN VIVO DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO
SOBRE A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL***

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Ghiotti de Siqueira

Rio Branco-Ac

03/2020



Universidade Federal do Acre

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental

**CULTIVO IN VIVO DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO SOBRE A EQUINOCOCOSE
POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

MÁBIA DE JESUS LIMA

COMISSÃO EXAMINADORA

Nilton Ghiotti de Siqueira, Prof. Dr.

(Universidade Federal do Acre / Hospital das Clínicas do Acre)

(Presidente)

Rosângela Rodrigues da Silva, Profa. Dra.

(Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – Rio de Janeiro)

Rita do Socorro Uchôa da Silva, Profa. Dra.

(Universidade Federal do Acre / Hospital das Clínicas do Acre)

Data da Dissertação: 18 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

À minha família, que é a minha base, e que mesmo com a enorme distância física, sempre se fez presente, me dando apoio para enfrentar meus desafios.

Ao meu orientador, que sempre se fez presente e disponível, me orientando com seriedade e carinho, fazendo coisas além de suas obrigações como orientador para que nossa pesquisa se concretizasse.

Aos pacientes que gentilmente se prontificaram a colaborar com a pesquisa.

Ao Estado do Acre, terra de meu pai, que me deu a oportunidade de realizar vários sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilton Ghiotti, que com recursos próprios financiou grande parte desta pesquisa.

À minha equipe de pesquisa, Maria Caroline Wiciuk, Ellen Morishigue e Viktor Magalhães, que tanto me auxiliaram

Ao meu marido, Robson Augusto, que me auxiliou com a confecção dos mapas utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Glauco, veterinário responsável por este projeto perante o CEUA.

Às professoras Dra. Rita do Socorro Uchôa da Silva e Dra. Rosângela Rodrigues e Silva, que se dispuseram a participar da banca avaliadora deste trabalho.

Aos meus professores Ms. Regis Hashimoto e Ms. Siglia França que, com muita empatia, me apoiaram nessa jornada dupla.

À equipe de professores do Mestrado em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre e principalmente ao Prof. Dr. Romeu Silva, que disponibilizou o uso do Laboratório de Experimentação Animal e os fomentos para sua manutenção.

À equipe do centro cirúrgico do Hospital das Clínicas do Acre, que nos apoiou durante a coleta das amostras.

À equipe do Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas do Acre – Fundhacre, principalmente à Sra. Neusa Barbosa, que auxiliou com a confecção das lâminas deste estudo.

À equipe do Centro de Ciências da Saúde e do Desporto da UFAC e às técnicas dos Laboratórios de Microscopia desta universidade, que permitiram o uso do laboratório para a realização de parte da pesquisa.

Obrigada, meus Deus, pois na fé encontrei a orientação que me faltava, e
no teu amor, o conforto que meu coração procurava!

(Autor Desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTAS DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA.....	13
1.2 PANORAMA GLOBAL E REGIONAL DA HIDATIDOSE.....	15
1.3 CICLO SELVAGEM E CICLO DOMÉSTICO DO <i>E. VOGELI</i>	16
1.4 ABORDAGEM MÉDICA DA EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA.....	22
1.5 HISTOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA DA DOENÇA HIDÁTICA.....	24
1.6 O CULTIVO <i>IN VIVO</i> E O USO DE COBAIAS NA PESQUISA EXPERIMENTAL.....	26
2. OBJETIVO.....	30
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	30
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	30
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. HIPÓTESE.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 TIPO DE ESTUDO.....	33
5.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE CISTOS HIDÁTICOS.....	33
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OS PACIENTES DOADORES DE AMOSTRAS.....	34
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DIAGNÓSTICA E VISUALIZAÇÃO DOS PROTOSCÓLECES.....	34
5.6 INOCULAÇÃO INTRAPERITONEAL DOS CAMUNDONGOS C57BL/6J.....	35
5.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL PARASITÁRIO ATRAVÉS DE EUTANÁSIA E NECRÓPSIA.....	36

5.8 APROVAÇÃO PELOS COMITÊS DE ÉTICA.....	37
6. RESULTADOS.....	38
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÃO.....	50
9. BIBLIOGRAFIA.....	51
10. ANEXOS.....	57

RESUMO

Introdução: A Equinococose Policística Neotropical humana, representa um grave problema de saúde na América do Sul. É uma doença parasitária que, assim como o nome sugere, causa lesões policísticas em diversos órgãos do ser humano, podendo, no entanto, ficar assintomática por vários anos. O modelo *in vivo* de equinococose fornece uma valiosa plataforma para investigar a biologia do parasita e rastrear drogas terapêuticas eficazes. **Objetivo:** Realizar cultivo *in vivo* de metacestoides do *Echinococcus vogeli* em camundongos C57BL/6J. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados como cobaias, 20 camundongos, 10 fêmeas e 10 machos, com idade de 4 e 7 meses. Para a inoculação intraperitoneal, os camundongos foram anestesiados com sevoflurano. Após a perda da consciência e a bradipneia dava-se início à injeção intraperitoneal do material cístico. Com uma seringa de 3ml e uma agulha de 0,7mm de calibre, foram inoculados 0,5ml de conteúdo cístico na região mediana infra umbilical da cavidade peritoneal de cada animal. **Resultados:** Dos 20 camundongos inoculados 6 morreram antes da data fixada para a eutanásia, não sendo encontrados cistos em suas necrópsias. Excluídos os óbitos, a porcentagem de sucesso foi de 93%, sendo que 100% dos cistos encontrados possuíam protoscóleces viáveis. **Conclusão:** É possível realizar, com sucesso, a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com cepas de *E. vogeli* da região da Amazônia Ocidental a partir da inoculação direta, em sua cavidade peritoneal, de material hidático de pacientes humanos infectados, mesmo que estes tenham feito uso de albendazol, já que o uso deste não provocou a perda da vitalidade do metacestoide. Com isso, abre-se a possibilidade de realizar replicações desta pesquisa para que se possa investigar terapias mais eficazes para esta doença endêmica.

Palavras-chave: *Echinococcus vogeli*, experimentação animal, hidatidose.

ABSTRACT

Introduction: Human Neotropical Polycystic Echinococcosis represents a serious health problem in South America. It is a parasitic disease that, as the name suggests, causes polycystic lesions in several human organs, although it can be asymptomatic for several reasons. years. The in vivo echinococcosis model provides a valuable platform for investigating the biology of the parasite and tracking effective therapeutic drugs.

Objective: To perform in vivo cultivation of *Echinococcus vogeli metacestoides* in C57BL/6J mice. **Materials and Methods:** were used as laboratory animals, 20 mice, 10 females and 10 males, aged 4 and 7 months. For intraperitoneal inoculation, the mice were anesthetized with sevoflurane. After loss of consciousness and bradypnea, intraperitoneal injection of cystic material was started. With a 3ml syringe and a 0.7mm gauge needle, 0.5ml of cystic content was inoculated into the infra-umbilical median region of the peritoneal cavity of each animal. **Results:** Of the 20 inoculated mice, 6 died before the deadline for euthanasia, and no cysts were found in their necropsies. Excluding deaths, the percentage of success was 93%, with 100% of the cysts found having viable prostheses. **Conclusion:** It is possible to successfully carry out experimental infection of C57BL / 6J mice with *E. vogeli* strains from the Western Amazon region by directly inoculating hydatid material from infected human patients in their peritoneal cavity, even if they have made use of albendazole, as the use of albendazole did not cause the loss of the metacestoid's With this, the possibility of replicating this research opens up so that more effective therapies for this endemic disease can be investigated.

Key words: *Echinococcus vogeli*, animal experimentation, hydatidosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo selvagem e domiciliar da equinococose policística causada pelo <i>Echinococcus vogeli</i>	17
Figura 2: Distribuição geográfica do Cachorro-do-mato-vinagre (<i>Speothos venaticus</i>) na América do Sul e no Brasil.....	19
Figura 3: Distribuição geográfica da Hidatidose Humana por <i>Echinococcus vogeli</i> na América do Sul e no Brasil.....	20
Figura 4: Confluência entre a ocorrência de <i>Speothos venaticus</i> e Hidatidose Humana por <i>Echinococcus vogeli</i> na América do Sul e no Brasil.....	21
Figura 5: Anestesia e Inoculação do material hidático.....	36
Figura 6: Protoscólecex íntegros das amostras humanas.....	38
Figura 7: Cisto Hidático no peritônio parietal.....	40
Figura 8: Inventário da cavidade abdominal.....	41
Figura 9: Cistos hidáticos aderidos ao mesentério.....	42
Figura 10: Aderência e reação inflamatória causada pelos cistos hidáticos.....	43
Figura 11: Caracterização microscópica dos cistos hidáticos de <i>Echinococcus vogeli</i>	45

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Abreviaturas

CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação
CC	Corpúsculos Calcários
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	camada germinativa interna
CID-10	Classificação Estatística Internacional de doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CL	Camada laminada ou cuticular externa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Cápsula Prolígera
<i>E. granulosos</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
<i>E. vogeli</i>	<i>Echinococcus vogeli</i>
<i>E. oligarthrus</i>	<i>Echinococcus oligarthrus</i>
et. al	e outros
FCF-IQ/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Instituto de Química/ Universidade de São Paulo
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
FUNDHACRE	Fundação Hospital Estadual do Acre
HE	Hematoxilina-Eosina
PSC	Protoscólece
PSC-E	Protoscólece evaginado
PSC-I	Protoscólece invaginado
R	Rostelo
sp.	Espécie
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAC	Universidade Federal do Acre
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
V	Ventosa

Siglas e símbolos

µm	Micrômetro (micras)
----	---------------------

1-INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A Equinococose Policística Neotropical humana (ou hidatidose policística), representa um grave problema de saúde na América do Sul (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). É uma doença parasitária que, assim como o nome sugere, causa lesões policísticas em diversos órgãos do ser humano, podendo, no entanto, ficar assintomática por vários anos (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). Seus sintomas são bastante inespecíficos, sendo geralmente identificada durante exames de imagem para avaliação de outras doenças (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Seu principal agente na Amazônia Brasileira é o *Echinococcus vogeli*, um parasita da classe Cestoda, família *Taeniidae* (MALDONADO *et al.*, 2019). Além do *E. vogeli*, a Equinococose Neotropical também pode ser causada pelo *E. oligarthrus* (MALDONADO *et al.*, 2019), contudo, apenas 5 casos foram descritos na literatura (SOARES *et al.*, 2013). A nomenclatura Neotropical se refere ao fato de a ocorrência de contaminação por esta parasitose estar até então restrita aos países latino-americanos que fazem parte da zona tropical do globo terrestre (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Existem, na atualidade, nove espécies conhecidas de *Echinococcus*, que são: *E. shiquicus*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, *E. multilocularis* e 3 genótipos de *E. granulosus* (G6, G7 e G8) (NAKAO *et al.*, 2006). Contudo, apenas *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, *E. multilocularis* e *E. granulosus* possuem real importância médica (SANTOS *et al.*, 2013; ROMIG *et al.*, 2017). O *E. granulosus* tem distribuição mundial, sendo o agente da Equinococose cística, o *E. multilocularis* ocorre nas regiões frias do globo (DAVIDSON *et al.*, 2016) e provoca a forma alveolar. Já o *E. oligarthrus* e o *E. vogeli* ocorrem apenas nas Américas central e do Sul (neotropicais) e provocam respectivamente a Equinococose Unicística e Policística (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Os nomes das doenças provocadas pelas diferentes espécies de *Echinococcus* em seus hospedeiros intermediários, como por exemplo, Equinococose Cística ou Equinococose Policística, correspondem respectivamente à forma de apresentação de

seus cistos, pois a análise imaginológica ou anatomopatológica destes, é uma das maneiras de realizar a diferenciação entre as espécies (D'ALESSANDRO& RAUSCH, 2008). Contudo, a forma mais utilizada para diferenciar as espécies é através da análise morfométrica dos ganchos do metacestóide por microscopia óptica e por análise genética, sendo que esta última, por seu alto custo, acaba sendo mais usada em pesquisas científicas (SANTOS *et al.*, 2012). Além disso, há diferença epidemiológica entre as regiões geográficas de ocorrência, e conseqüentemente, diferença entre as espécies de hospedeiros naturais para cada espécie de *Echinococcus* (ROMIG *et al.*, 2017).

Em alguns países considerados como zona endêmica de hidatidose, como por exemplo no Chile e na Argentina, ela é classificada como doença de notificação obrigatória, o que não acontece nos estados brasileiros, exceto para o Rio Grande do Sul (BRASIL, 2016). Isto dificulta o entendimento sobre o real estado da doença em nosso país onde ocorrem três dessas espécies (D'ALESSANDRO& RAUSCH, 2008).

O Brasil, por ser um país de proporções continentais, possuindo em seu território regiões de clima tropical e temperado, apresenta a Equinococose Policística Neotropical e a Equinococose Cística, sendo esta última a mais conhecida no Brasil (BRASIL, 2011). O país ainda possui grandes áreas de natureza preservada, como a Amazônia, o Pantanal e a Mata Atlântica, contudo, na medida em que o homem vai estabelecendo moradias nestas áreas e as transformando em zonas de produção rural, traz para o peridomicílio uma doença que até então estaria restrita ao ambiente selvagem (ROMIG *et al.*, 2017).

Os principais dados sobre Equinococose no Brasil são provenientes do sul do país, principalmente do estado do Rio Grande do Sul, devido a notificação obrigatória, local brasileiro de maior índice de casos de Hidatidose por *E. granulosus* (FARIAS *et al.*, 2004). No estado do Acre e em toda região amazônica, o principal agente etiológico da hidatidose é o *Echinococcus vogeli*, contudo, há também relatos de casos de infecção autóctone por *E. vogeli* no Sudeste e Centro-Oeste do país (BRASIL, 2011).

Por manifestar-se clinicamente na população economicamente ativa, esta doença é responsável por prejuízos tanto na saúde das pessoas e famílias afetadas, quanto à

economia do país, devido ao afastamento do trabalho e gastos com o tratamento (WHO, 2001; MONTÚFAR-VALER & HUAPAYA-JURADO, 2014; VENEGAS, ESPINOZA & SÁNCHEZ, 2014). Em um estudo feito por Venegas (2014), sobre o impacto econômico da Equinococose Cística no Chile, sugere que é preciso conhecer detalhadamente os fatores regionais e culturais que contribuem para a endemicidade da doença, de forma que esse conhecimento possibilite a criação de programas mais eficientes de prevenção e de controle (VENEGAS, ESPINOZA & SÁNCHEZ, 2014).

Algumas possíveis causas que impedem a erradicação da hidatidose são a existência de diferentes ciclos de transmissão parasitária ainda não elucidada, como por exemplo, a presença de outras espécies de hospedeiros (NAKAO *et al.*, 2006; MOKS *et al.*, 2008; MORO & SCHANTZ, 2009), a persistência de comportamentos de risco nas comunidades locais, a deficiência na detecção de cães infectados, a subnotificação da doença e a insuficiência de campanhas educativas preventivas (WHO, 2001; MORO & SCHANTZ, 2009).

1.2 PANORAMA GLOBAL E REGIONAL DA HIDATIDOSE

A Equinococose é considerada pela OMS uma dentre as 17 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's) que afetam principalmente as populações que vivem em extrema pobreza, causando sofrimento, incapacidades permanentes e até mesmo a morte (MORO & SCHANTZ, 2009; WHO, 2015a). Com isso, atualmente ela faz parte das doenças visadas para a interrupção da transmissão ou eliminação até 2022 (WHO, 2015a).

Para que se cumpra os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável é fundamental que se alcance as metas globais para água e saneamento, visto que segundo a OMS, aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas ainda não dispõem de instalações sanitárias básicas, como banheiros e latrinas e mais de 660 milhões continuam a beber água imprópria para consumo (WHO, 2015). A região norte é apontada pelo IBGE, como a segunda região com maior índice de pobreza no Brasil, o que a faz extremamente

suscetível às doenças infecciosas associadas às más condições de vida, como por exemplo a hidatidose (IBGE, 2017).

Embora já tenha havido um progresso em alguns países, os estudos e estimativas sobre a hidatidose humana no Brasil são escassos, assim como seus aspectos biológicos, epidemiológicos e clínicos. Tudo isso torna inviável uma abordagem eficaz dessa zoonose (OPAS, 2017). No entanto, há um consenso internacional de que a busca por conhecimentos e ferramentas disponíveis poderão permitir o controle da maioria dessas doenças zoonóticas negligenciadas (IBGE, 2017).

1.3 CICLO SELVAGEM E CICLO DOMÉSTICO DO *E. VOGELI*

O *E. vogeli*, é um parasita heteroxênico, ou seja, necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida, sendo capaz de se reproduzir sexuada e assexuadamente em seus hospedeiros definitivos e intermediários respectivamente (THOMPSON, LYMBERY, 1995). Ele possui dois ciclos de transmissão, o Ciclo Selvagem e o Ciclo doméstico (NUNES, 2004). No ciclo selvagem, o Cachorro-do-Mato-Vinagre (*Speothos venaticus*) é o hospedeiro definitivo e a paca (*Cuniculus paca*), o principal hospedeiro intermediário mantendo um ciclo fechado entre presa e predador (D'ALESSANDRO *et al.*, 1979; MENEGHELLI, MARTINELLI & VELLUDO, 1990). No ciclo doméstico o cão de caça (*Canis lupus familiaris*) faz o papel de hospedeiro definitivo e o ser humano comporta-se como hospedeiro intermediário, sendo denominado hospedeiro acidental (VIZCAYCHIPI *et al.*, 2013).

Além da paca, outros roedores também fazem o papel de hospedeiro intermediário, como a cutia, o tatu, entre outros (SOARES, 2004). Tanto a infecção do hospedeiro intermediário, quanto a infecção humana, ocorre através da ingestão de insumos contaminados por ovos do parasita depositados nas fezes de canídeos infectados pela doença, desenvolvendo apenas a fase larval desse platelminto e não sendo então um transmissor da doença aos seus semelhantes (ROMIG *et al.*, 2017).

Ao alimentar seus cães com as vísceras de caças contaminadas pelas formas larvárias, tornam estes canídeos hospedeiros definitivos do parasita (FIGURA 1). Estes,

por conseguinte, contaminam o meio ambiente peridomiciliar com os ovos do helminto (D’ALESSANDRO *et al.*, 1979). Após ingerir água ou alimentos contaminados, ocorre a eclosão desses ovos e liberação de estágios larvários denominados oncosferas, as quais penetram no intestino e através principalmente da circulação portal, ganham acesso às vísceras do hospedeiro. Neste local se desenvolverão em metacestoides ou hidátides (D’ALESSANDRO *et al.*, 1979). O fígado é o órgão mais acometido pelos cistos, porém a doença pode também afetar outros órgãos através de metástases (WHO, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

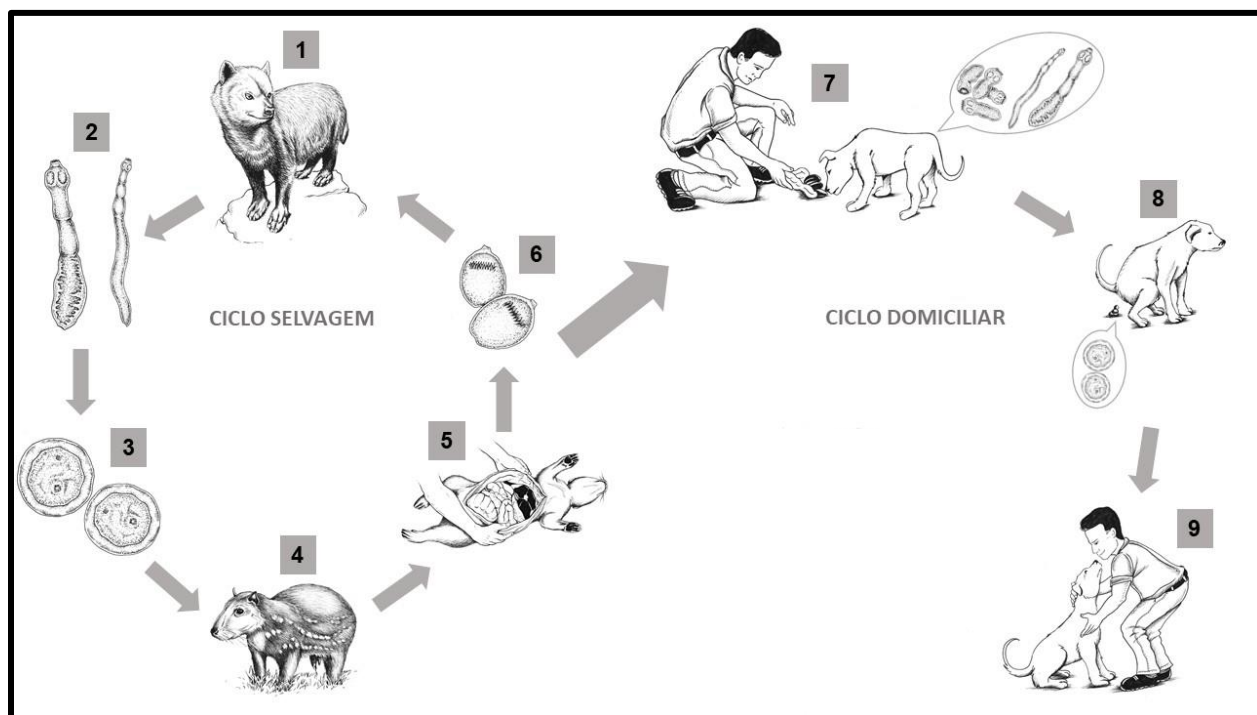


Figura 1. Ciclo selvagem e domiciliar da Equinococose Policística causada pelo *E. vogeli*. (1) Hospedeiro definitivo: Cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*); (2) Cestoide de *E. vogeli* no intestino do canídeo; (3) Ovos liberados no ambiente através das fezes do canídeo; (4) Hospedeiro intermediário: paca (*Cuniculus paca*); (5) Paca abatida com vísceras contaminadas por larvas de *E. vogeli*; (6) Protoscólecex de *E. vogeli*; (7) Homem alimentando o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), que desenvolve o verme adulto; (8) Ovos sendo eliminados pelas fezes no peridomicílio; (9) Homem se contamina através da ingestão de insumos contaminados pelos ovos ou contato direto com os canídeos.

Adaptado de Lima *et al.* (2019).

Quando se cruzam as pesquisas de distribuição geográfica do cachorro-do-mato-vinagre com a representação geográfica da incidência de casos de Hidatidose Policística, é possível inferir que o índice de infecção pela doença, tem relação direta com a população de hospedeiros definitivos existentes na região (FIGURAS 2, 3 e 4), visto que este animal é encontrado em maior densidade nos biomas Amazônia e Pantanal respectivamente (BRASIL, 2011; JORGE *et al.*, 2013). Também é encontrado nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, contudo apresentam-se criticamente ameaçados de extinção por seu abate durante a caça e devido a degradação de seu habitat natural, pois não é sinantrópico (JORGE *et al.*, 2013; TIEPOLO, QUADROS & PITMAN; 2016).

Além da presença de seu hospedeiro definitivo, o hábito de caçar, muito comum na região amazônica e no estado do Acre, é fator principal que torna o homem dessa região bastante suscetível à doença (D'ALESSANDRO *et al.*, 1979; MARTINELLI & VELLUDO, 1990; FUCCIO, CARVALHO, VARGAS, 2003; MENEGHELLI).

Distribuição geográfica de *Speothos venaticus* na América do Sul



FIGURA 2 – Distribuição geográfica do Cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) na América do Sul e no Brasil (JORGE *et al.*, 2013).

**Distribuição geográfica da Hidatidose Humana
por *Echinococcus vogeli* na América do Sul e no Brasil**



FIGURA 3 – Distribuição geográfica da Hidatidose Humana por *Echinococcus vogeli* na América do Sul e no Brasil (Brasil, 2011)

**Confluência entre
ocorrência de *Speothos venaticus* e Hidatidose Humana
(por *Echinococcus vogeli*) na América do Sul**



FIGURA 4 – Confluência entre a ocorrência de *Speothos venaticus* e Hidatidose Humana por *Echinococcus vogeli* na América do Sul e no Brasil.

1.4 ABORDAGEM MÉDICA DA EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA HUMANA

Os sintomas da Equinococose são bastante inespecíficos e dependem da localização das lesões (DÍAZ *et al.*, 2011). Os principais sinais e sintomas produzidos pelos cistos hepáticos são dor, massa palpável, icterícia e febre, enquanto os cistos pulmonares podem causar hemoptise e vômitica (PINTO, 2017). A doença pode apresentar complicações decorrentes da compressão de órgãos adjacentes, obstrução e/ou fístulas biliares, rotura do cisto na cavidade abdominal provocando uma inflamação sistêmica e choque anafilático, ou infecção secundária, provocando o surgimento de abscesso (DÍAZ *et al.*, 2011; ALEXIOU *et al.*, 2012; PINTO, 2017).

Por apresentar sinais e sintomas bastante inespecíficos, seu diagnóstico inicial é baseado nos antecedentes epidemiológicos, nos exames de imagem, como Ultrassonografia (USG) ou Tomografia Computadorizada (TC) e nos exames sorológicos (PINTO, 2017). No Brasil, o diagnóstico sorológico para Equinococose Policística é realizado através da técnica de Imunoblot IgG para *E. granulosus*, através de reação cruzada (GOTTSTEIN, D'ALESSANDRO & RAUSCH, 1995).

A Equinococose Policística pode ser classificada por suas manifestações clínicas em cinco tipos (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008). O tipo I se refere a doença restrita ao fígado e cavidade abdominal, o tipo II inclui insuficiência hepática, o tipo III se refere a metástases hepáticas para a região torácica, o tipo IV restringe os cistos apenas ao mesentério e o tipo V consiste na calcificação dos cistos hepáticos e pulmonares (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

Um fato que pode explicar a maior prevalência do fígado como órgão de desenvolvimento da doença em seres humanos, é que o crescimento e a formação de protoscólecex dependem de fatores solúveis de baixo peso molecular liberados pelos hepatócitos (JURA *et al.*, 1996). A função de filtro sanguíneo realizada primeiramente pelo fígado, durante o trajeto do parasita no organismo humano, seria também determinante para esta prevalência, o mesmo raciocínio também serve para os pulmões (PINTO, 2017).

Segundo a classificação da OMS, a conduta de tratamento a ser adotada dependerá do tipo de cisto e do seu tamanho (WHO, 2015). Contudo, é importante dizer que estas condutas se baseiam na Equinococose Cística, provocada pelo *E. granulosus*, visto que a Equinococose Policística, possui características específicas e nem mesmo é citada por esta organização em seu manual.

O tratamento definitivo para a hidatidose é cirúrgico (WHO, 2001; MONTÚFAR-VALER & HUAPAYA-JURADO, 2014; PINTO, 2017). No entanto, a escolha do tipo de abordagem dependerá da região anatômica afetada e do número de cistos entre outras situações clínicas apresentadas individualmente por cada paciente (MONTÚFAR-VALER & HUAPAYA-JURADO, 2014).

Caso o paciente não possa ser submetido ao tratamento cirúrgico, a alternativa de tratamento atual mais utilizada é o uso de quimioterapia diária com albendazol podendo ser associado a inibidores H1 ou omeprazol em caso de intolerância estomacal leve (PINTO, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Contudo, na grande maioria dos pacientes, essa medida não é capaz de levar à cura, visto que a medicação possui um efeito parasitostático e não parasiticida (INGOLD *et al.*, 1999).

As doses máximas diárias recomendadas são de 400mg para crianças com menos de 40 quilos e 800mg para adultos. Deve-se lembrar que o albendazol é contraindicado em crianças menores de dois anos, gestantes, pacientes com hepatopatia crônica, epilepsia ou hipersensibilidade aos seus componentes. Seus principais efeitos colaterais são: leucocitose, elevação das transaminases, elevação da bilirrubina (PINTO, 2017).

É importante então, solicitar hemograma completo, perfil hepático e creatinina antes de iniciar o tratamento e após 30 dias de seu início. Deve-se interromper o tratamento por 15 dias se houver intolerância medicamentosa ou alteração dos exames laboratoriais, repetindo-os novamente após esse prazo. Caso os valores voltem a se normalizar após os 15 dias, o tratamento deve ser reiniciado, caso contrário, o tratamento quimioterápico deve ser suspenso e reavaliada a possibilidade de uma conduta cirúrgica (PINTO, 2017).

Em um estudo realizado por Siqueira *et al.* (2013) foi concluído que o tratamento cirúrgico produziu maior número de “cura” e “melhora clínica” em relação ao tratamento puramente clínico. Neste mesmo estudo, foi utilizada uma adaptação do sistema de classificação PNM de Kern *et al.* (2006) para identificar quais pacientes deveriam se submeter ao tratamento cirúrgico e quais permaneceriam sob tratamento clínico. Utilizou essa classificação também para determinar a necessidade de transplante hepático, em alguns casos. No entanto, mesmo que a conduta escolhida seja a cirúrgica, é recomendada a realização da quimioprofilaxia com 10mg/kg/dia de albendazol durante pelo menos 15 dias antes da cirurgia e 3 meses após (PINTO, 2017).

Pacheco, ao estudar a Equinococose Cística, afirma que a cirurgia radical laparoscópica para tratar os cistos hidáticos não complicados, independentemente do seu tamanho e do segmento hepático que foi comprometido, é uma técnica segura, com baixa morbidade pós-operatória e mínima taxa de recorrência (PACHECO *et al.*, 2017). Contudo, não há estudos sobre essa abordagem cirúrgica para a Equinococose Policística, sendo um tema possível para pesquisas futuras.

1.5 HISTOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA DA DOENÇA HIDÁTICA

Apesar do diagnóstico inicial, necessário para a decisão da conduta, se basear principalmente nos achados imagiológicos e sorológicos, o diagnóstico definitivo só é possível através da análise histopatológica do cisto, ou seja, após sua excisão (ALMEIDA *et al.*, 2015). A análise histopatológica é positiva para Equinococose quando são visualizados elementos intrínsecos ao parasita como a presença de ganchos, protoscóleces (PSC) ou de sua camada laminada (SOARES, 2013). Cada espécie possui características peculiares destes elementos que as diferenciam umas das outras (D'ALESSANDRO & RAUSCH, 2008).

As características histopatológicas que diferenciam o *E. vogeli* das outras espécies de Equinococos são principalmente o tamanho e proporção de seus ganchos e a forma peculiar de sua camada laminada (SOARES, 2004). Os ganchos do *E. vogeli* são bem maiores que os ganchos das outras espécies, medindo em média 42 µm de

comprimento (SOARES, 2004). A nomenclatura das partes dos ganchos foi dada fazendo uma analogia com as estruturas constituintes de uma espada. Portanto, os ganchos são constituídos de lâmina, bainha e guarda (FIGURA 1). As proporções entre os comprimentos de cada parte também variam entre as espécies (D'ALESSANDRO, 1997; SOARES, 2004).

A camada laminada é uma membrana acelular externa produzida pelo parasita e é cercada por uma cápsula fibrosa inflamatória produzida pelo hospedeiro (ZHANG, LI, MCMANUS, 2003). Ela se diferencia por sua forma, composição e espessura específicas. A camada laminada do *E. vogeli* possui uma forma cerebroide espessa e é composta por 50% de proteínas (mucinas) e 50% de carboidratos ricos em galactose (DÍAZ *et al.*, 2011a, INGOLD *et al.*, 2001).

O *E. vogeli* apresenta dois tipos de proliferação. Um deles é a proliferação endógena, na qual a cápsula fibrosa do hospedeiro é preservada e vários cistos filhos são desenvolvidos a partir de capsulas prolíferas ou da camada germinativa, interna às dobras da membrana laminada, formando assim várias cavidades interconectadas (RAUSCH E D'ALESSANDRO, 1999; INGOLD *et al.*, 2001). O outro processo de crescimento, e talvez o mais importante para a formação de metástases, é dado através da proliferação exógena, na qual a capsula fibrosa produzida pelo hospedeiro é ultrapassada, gerando assim expansão para tecidos vizinhos (Rausch e D'Alessandro, 1999; INGOLD *et al.*, 2001).

Mesmo em cistos hidáticos totalmente degenerados, onde não é possível a visualização dos protoscólece ou ganchos, é possível identificar a camada laminada, que pode persistir por vários anos sem se degenerar, servindo, portanto, para o diagnóstico da doença nestes casos (INGOLD *et al.*, 2001). Esta camada externa também tem papel fundamental na interface parasita-hospedeiro, sendo responsável tanto por apresentar os antígenos responsáveis pela indução da produção de imunoglobulinas pelo hospedeiro, quanto por servir de proteção física ao parasita contra os ataques do sistema imune do hospedeiro (INGOLD *et al.*, 2001; DÍAZ *et al.*, 2011b).

Nos estágios iniciais da infecção, a resposta inflamatória é realizada pela imunidade mediada por células, verificado laboratorialmente por uma leucocitose, com

aumento principalmente de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos (ZHANG, LI, MCMANUS, 2003). O perfil de resposta imune do hospedeiro, além de interferir na suscetibilidade e desenvolvimento da infecção, também interfere na resposta ao tratamento quimioterápico com albendazol (ZHANG, LI, MCMANUS, 2003). Além de auxiliar na busca por melhores terapêuticas, o estudo dos fatores imunológicos pode auxiliar na criação de uma vacina humana para a Equinococose Policística, o que forneceria uma ferramenta valiosa no controle e profilaxia dessa doença.

1.6 O CULTIVO *IN VIVO* E O USO DE COBAIAS NA PESQUISA EXPERIMENTAL

Apesar de existirem várias técnicas para realizar cultivo de microrganismos, elas podem ser agrupadas em duas grandes categorias, que são a cultura *in vitro* e a cultura *in vivo* (HEMPHILL *et al.*, 2003). O uso de cultura *in vitro*, possibilita maior controle dos substratos disponibilizados no ambiente de cultivo. Isto é importante quando se pretende controlar e entender as ações de substâncias específicas como enzimas, minerais entre outras nas células do cultivo (HEMPHILL *et al.*, 2003). Contudo, esta técnica ainda não é capaz de simular completamente organismos multissistêmicos e complexos como os seres humanos, de forma a substituir o uso da cultura *in vivo* (HEMPHILL *et al.*, 2003; CHORILLI, MICHELIN & SALGADO, 2009). Em outras palavras, o uso de cobaias ainda é preconizado quando se trata de avaliar a interação sistêmica de uma determinada doença ou substância química (CHORILLI, MICHELIN & SALGADO, 2009).

Os estudos com modelos experimentais de animais têm sido bastante utilizados na investigação de eventos imunológicos e na interações parasita-hospedeiro (HEMPHILL *et al.*, 2003). Nas pesquisas científicas, os camundongos são os animais mais utilizados como modelo de doença (FAGUNDES & TAHA, 2004). Assim, um modelo animal de doença deve ter características semelhantes às do doente original, podendo ser manipulado com limitações éticas menos restritivas do que as impostas ao experimento com seres humanos (FAGUNDES & TAHA, 2004). Tal similaridade é necessária, pois, para a indução do cisto hidático, é preciso que o peritônio do animal seja suscetível à infecção, como é o caso do C57BL/6 (HEMPHILL *et al.*, 2003).

A utilização de camundongos C57BL/6 para a conservação laboratorial de amostras de cistos hidáticos de *E. vogeli* é utilizada há alguns anos em grandes centros de pesquisa desta doença. O C57BL/6J, é uma espécie isogênica produzida laboratorialmente e conservada através de cruzamentos consanguíneos, de forma a satisfazer a necessidade de manter pouca variabilidade genética (DAMY *et al.*, 2010). Isto reduz as interferências que essa variável causaria na suscetibilidade individual de desenvolvimento da doença hidática.

Além da utilização de camundongos com baixa variabilidade genética, também já foi descrita na literatura científica a utilização de clones de *Echinococcus*, como o KF5 de *E. multilocularis*, ou seja, cepas geneticamente idênticas. Porém, não há relatos sobre essa prática de clonagem para o *E. vogeli* até o momento (INGOLD *et al.*, 1999; STETTLER *et al.*, 2001). O cultivo de cepas mais agressivas de *E. vogeli* em camundongos poderia auxiliar na conservação desses exemplares para estudos posteriores.

O uso de pesquisa experimental em animais é feito em todos os campos da pesquisa biológica (FAGUNDES & TAHA, 2004). Os modelos animais servem, de uma forma especial, para investigar interações parasita-hospedeiro e eventos imunológicos dessa interface (HEMPHILL *et al.*, 2003). Estas pesquisas são desenvolvidas como forma de estudar causas, mecanismos e tratamentos das várias doenças, evitando que o *Homo sapiens* sofra consequências indesejáveis e eticamente inaceitáveis caso a experiência fosse realizada diretamente em seu próprio organismo (SALÉN; 1994).

É fundamental que a espécie testada tenha predisposição a desenvolver fenômenos patológicos semelhantes aos ocorridos na espécie humana para que possa assim haver extrapolação dos resultados e para que a doença animal sirva como modelo confiável (FAGUNDES & TAHA, 2004). Assim, a doença animal pode ser induzida experimentalmente, permitindo a escolha livre da espécie a ser estudada (SALÉN; 1994). Contudo, para que isso ocorra, é preciso que haja critérios bem estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais, de forma a minimizar o sofrimento desses animais (PACHECO, SAAD & TREVIZAN, 2012).

O rato e o camundongo, apesar de diferir filogeneticamente do ser humano, são os animais mais frequentemente utilizados como modelo de doença nas pesquisas (FAGUNDES, DJALMA & MURCHED, 2004). Isto se deve muito provavelmente pela facilidade de manejo e relativo baixo custo, quando comparado ao custo benefício da pesquisa com outras espécies (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA; 2002). O metabolismo dos camundongos é muito mais acelerado que o dos humanos. Isso está diretamente relacionado às vias e mecanismos de metabolização de drogas e toxinas ligadas aos fluidos e tecidos corporais (FAGUNDES & TAHA, 2004).

Vários autores descreveram a técnica de inoculação ou transplante, mas nenhum dos autores descreve em detalhes. A técnica de inoculação utilizada por Hemphill e Gottstein (1995), os animais receberam uma injeção intraperitoneal única de 1 ml de suspensão parasitária e após 4 meses, foram eutanasiados. Spiliotis & Brehm (2009) também descreveram em detalhes algumas etapas necessárias para manter *E. multiloculares* em roedores de laboratório, utilizando também 1 ml de suspensão parasitária, retirada de pacientes humanos, para a infecção intraperitoneal de Gerbils (*Meriones unguiculatus*), mas utilizando um tempo menor de dois a três meses para o desenvolvimento da doença e sacrifício do animal.

Além da diferença entre o processamento do material inoculado e do tempo entre a inoculação e o sacrifício, nas pesquisas anteriores também houve muita discrepância entre a quantidade de cobaias a serem usadas. Wang et al (2016) usou 10 camundongos BALB com idades entre 6 e 8 semanas, sendo infectados por PSC de *E. Multilocularis*. Para infectar os animais, ele transplantou para o peritônio 30 pequenas vesículas de *E. Multilocularis*, aguardando 6 meses para a realização da eutanásia, coleta e análise histopatológica da massa parasitária intraperitoneal (WANG *et al.*, 2016).

A cultura do patógeno a ser estudado, além de permitir um estudo controlado de variáveis, permite a manutenção de amostras viáveis para estudos posteriores (WANG *et al.*, 2016). Raush e D'Alessandro (1999), por exemplo, realizaram um estudo detalhado do mecanismo de patogênese da hidatidose policística através da inoculação de metacestoides na cavidade peritoneal de 281 Gerbils entre outros animais. Em estudo posterior, metacestoides isolados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

foram utilizados para a produção de cultura *in vitro* de *E. vogeli*, possibilitando com isso o estudo mais detalhado de várias estruturas bioquímicas do parasito (INGOLD *et al.*, 2001).

O modelo *in vivo* de equinococose fornece uma valiosa plataforma para investigar a biologia do parasita e rastrear drogas terapêuticas eficazes (WANG *et al.*, 2016). Por isso, vários pesquisadores desenvolveram diferentes técnicas para o cultivo de cistos das diferentes espécies de equinococose em cobaias de laboratório (RAUSCH & D'ALESSANDRO, 1999; INGOLD *et al.*, 1999; INGOLD *et al.*, 2001; SPILIOTIS & BREHM; 2009; WANG *et al.*, 2016)

2- OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Realizar cultivo *in vivo* de metacestoides do *Echinococcus vogeli* em camundongos C57BL/6J

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a incidência de infecção hidática nos camundongos, mesmo com o uso de cistos de pacientes tratados previamente com albendazol por vários anos.
- Realizar um estudo detalhado do material hidático amostral, quanto à sua morfologia, macroscópica e microscopicamente.
- Descrever o modelo experimental para possível replicação do experimento, de forma a facilitar posteriores estudos.

3- JUSTIFICATIVA

Apesar de já existirem pesquisas científicas usando Camundongos C57BL/6 para o cultivo intraperitoneal de cistos hidáticos, nenhum deles foi realizado com amostras do *E. vogeli* no Brasil, o que torna este, um estudo pioneiro para o país. A inoculação de material hidático fresco aspirado dos cistos humanos intraperitonealmente em camundongos, como técnica de cultura *in vivo* promove a possibilidade de fortalecer os estudos sobre a doença na própria região endêmica.

Além disso, na prática médica, percebe-se que o uso de albendazol (metil 5(propil-tio 1H benzimidazol-2 yl) não é completamente eficaz na eliminação da doença na maioria dos pacientes. Através deste experimente será possível observar a vitalidade e a capacidade reprodutiva do parasita, mesmo após vários anos de uso de Albendazol pelos pacientes. Em futuras reproduções deste experimento, há também a possibilidade de realizar experimentos cirúrgicos, medicamentosos e profiláticos, como a criação de novas vacinas para os animais domésticos e até mesmo para humanos e desta forma, estimular estudos experimentais posteriores sobre a doença.

4- HIPÓTESE

- O desenvolvimento de uma técnica de inoculação de cistos hidáticos de *E. vogeli*, retirados de humanos e imediatamente inoculados em camundongos sem que haja adição de outros componentes químicos prévios ao material inoculado, é possível.
- Pacientes previamente tratados com albendazol, permanecem com cistos ativos, aptos à proliferação.
- Essa técnica simplificará o processo de cultivo desses cistos, e conseqüentemente, auxiliará estudos posteriores que necessitem replicá-la.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO:

Estudo experimental.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE CISTOS HIDÁTICOS:

A coleta das amostras foi realizada no Centro Cirúrgico da Fundação Hospitalar Estadual do Acre (FUNDHACRE), na cidade de Rio Branco, Acre. O material hidático foi obtido a partir de dois pacientes diagnosticados e tratados cirurgicamente para hidatidose, sendo um paciente operado em maio de 2019 e outro em agosto do mesmo ano.

O primeiro paciente doador de amostras hidáticas era do sexo feminino, 54 anos de idade, natural de Sena Madureira – AC. Paciente sem outras comorbidades, apresentando lesões hidáticas confluentes em segmentos VI e VII e colelitíase, fez uso de albendazol desde fevereiro de 2018, sendo submetida à Segmentectomia do VI e VII e colecistectomia em 17/05/2019.

O segundo paciente, também do sexo feminino, 46 anos, natural de Sena Madureira – AC. Paciente sem outras comorbidades, possuía diagnóstico de Hidatidose desde o ano de 2004. Inicialmente, fez uso de albendazol por 6 meses, ficando assintomática. Em agosto de 2016 voltou a fazer uso de albendazol, por apresentar dor abdominal, sendo a medicação mantida de forma contínua. A tomografia computadorizada (TC) de abdome revelava múltiplos cistos em todo o lobo hepático direito, preservando o tronco portal, sendo submetida à hepatectomia direita em 16/08/2019.

Após a excisão dos cistos, os mesmos foram separados assepticamente e abertos para a retirada do material hidático. Estas amostras frescas foram colocadas em frascos estéreis e transportadas para o Laboratório de Patologia e Parasitologia da Universidade Federal do Acre (UFAC), onde se iniciou outra etapa do experimento.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OS PACIENTES DOADORES DE AMOSTRAS:

Os Critérios de inclusão para os pacientes doadores de amostras foram: terem sido tratados cirurgicamente para hidatidose na FUNDHACRE, no período fevereiro a agosto de 2019, terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ser morador do estado do Acre ou de municípios de fronteira, ao qual entram como Hospedeiros acidentais da região Amazônica e terem cistos viáveis.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídas as amostras dos pacientes cujos cistos não apresentavam protoscóleces viáveis, quando estavam associados a abscessos ou grandes calcificações, ou mesmo quando o paciente possuía alguma comorbidade infecciosa que pudesse prejudicar a imunidade das cobaias, como o HIV (vírus da imunodeficiência humana).

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DIAGNÓSTICA E VISUALIZAÇÃO DOS PROTOSCÓLECES:

No Laboratório de Patologia e Parasitologia da UFAC, as amostras retiradas dos pacientes, foram analisadas microscopicamente com o intuito de confirmar o diagnóstico através da visualização dos protoscóleces e ganchos hidáticos, sua morfologia e morfometria, e principalmente de confirmar a vitalidade dos protoscóleces.

A confecção das lâminas para a análise diagnóstica foi feita através da técnica de esfregaço, utilizando uma pequena parte da amostra sobre uma lâmina fosca lapidada 26.0 x 76.0mm, espessura \approx 1.0 a 1.2mm. Foram utilizados para a coloração o dibromato de potássio a 2% e Hematoxilina-eosina 1%. Os critérios utilizados para a confirmação da vitalidade dos protoscóleces foi baseada na integridade de sua morfologia e turgidez destes, assim como descrito por Ingold *et al.* (1999).

5.6 INOCULAÇÃO INTRAPERITONEAL DOS CAMUNDONGOS C57BL/6J:

Após confirmada a presença de protoscócecos íntegros, a amostra foi levada ao Laboratório de Experimentação Animal da instituição, onde se iniciou a etapa de infecção intraperitoneal dos camundongos.

Foram utilizados como cobaias, 20 camundongos da espécie C57BL/6J, 10 fêmeas e 10 machos, com idade de 4 meses na primeira inoculação e 7 meses na segunda, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

A primeira sessão de inoculação, foi realizada em 17 de maio de 2019, em três casais de camundongos e a segunda inoculação foi realizada no dia 16 de agosto de 2019 com sete casais. A segunda inoculação foi necessária, visto que a quantidade de material obtido do primeiro paciente foi insuficiente para a inoculação de todos os camundongos.

A técnica de inoculação utilizada neste trabalho foi baseada na técnica proposta por Hemphill e Gottstein (1995). Contudo, devido ao pequeno tamanho dos camundongos utilizados neste trabalho, apenas 0,5ml foram utilizados para a inoculação. Além disso, o material inoculado não foi previamente processado, sendo implantado com amostras retiradas diretamente dos cistos dos pacientes.

Para a inoculação intraperitoneal, os camundongos foram anestesiados com um chumaço de algodão embebido em sevoflurano sob um funil de vidro até a perda da consciência e observação de bradipneia. Após a perda da consciência e a bradipneia, estes eram retirados de sob o funil e dava-se início à injeção intraperitoneal do material cístico. Com uma seringa de 3ml e uma agulha de 0,7mm de calibre, foram inoculados 0,5ml de conteúdo cístico na região mediana infra umbilical da cavidade peritoneal de cada animal (FIGURA 5). Inicialmente os camundongos estavam sendo mantidos separados por sexo em duas caixas grandes, e assim que foram inoculados, foram separados em duplas ainda separados por sexo em caixas menores.

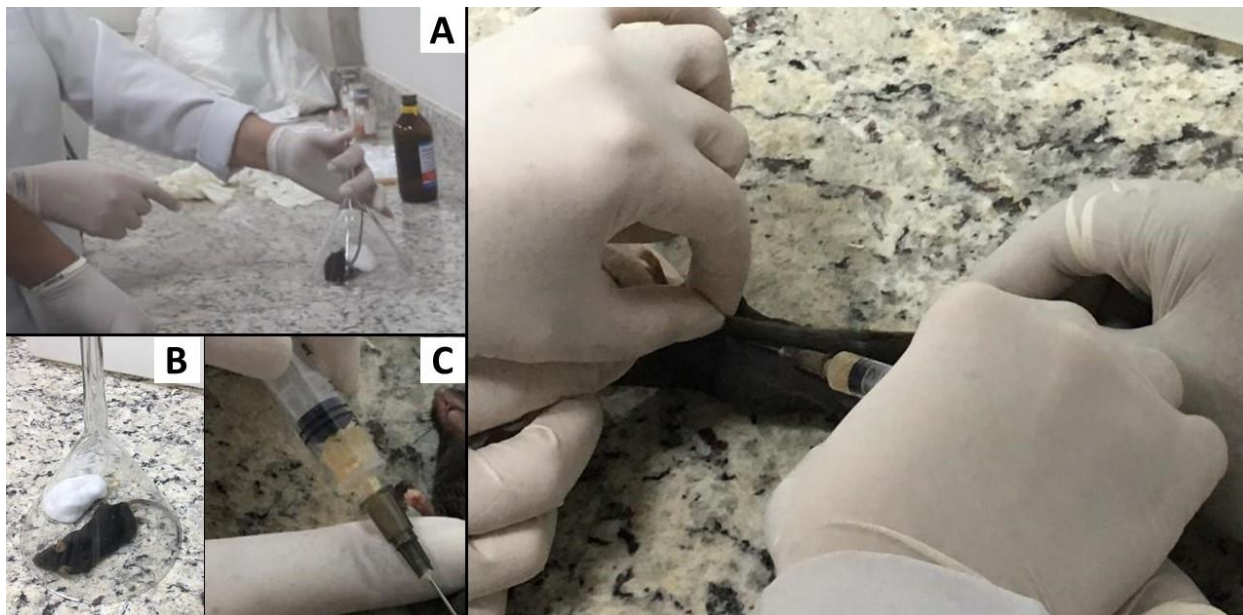


FIGURA 5 – Anestesia e inoculação do material hidático. (A) O camundongo dentro do funil de vidro junto a um chumaço de algodão embebido de sevoflurano. (B). Aguardado até perda da consciência e bradipneia. (C). Em cada camundongo foi inoculado 0,5ml de material hidático. (D). Inoculação em abdome inferior das cobaias.

Durante o tempo entre a inoculação e a eutanásia, os animais receberam água potável e ração padrão, *ad libitum*, permanecendo em condições ambientais de temperatura de 22°C, umidade relativa média de 55% e exaustão contínua, obedecendo ao ciclo de claro e escuro na proporção de 12 horas claro e 12 horas escuro, conforme o modelo utilizado pelo Manual de Cuidados e Procedimentos do com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP e pelo Curso de manipulação de animais de laboratório (PAIVA, MAFFILI & SANTOS, 2005; SANTOS *et al.*, 2013).

5.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL PARASITÁRIO ATRAVÉS DE EUTANÁSIA E NECRÓPSIA:

A realização da eutanásia humanitária obedeceu aos princípios das Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, sendo o procedimento de escolha, a eutanásia com utilização sevoflurano até a perda da consciência e ausência de respiração e batimentos cardíacos, seguido de deslocamento cervical, para garantir a morte ao animal de forma indolor. A utilização de anestésico intraperitoneal mostrou-se inviável, por ser o local de

implantação do cisto, de forma que sua administração poderia prejudicar os resultados da pesquisa. As sessões de eutanásia foram realizadas após os 4 meses da primeira e da segunda inoculação, respectivamente, nos dias 27 de outubro e 7 de dezembro.

Para avaliar se a implantação e cultivo intraperitoneal foram bem-sucedidos, após a eutanásia foi realizada uma incisão abdominal mediana, seguida do inventário da cavidade, sendo verificada a incidência de cistos nos órgãos abdominais. Nos tecidos em que foram identificados cistos, estes foram removidos e mergulhados em formol a 10% para confecção de lâminas microscópicas. Estas foram confeccionadas pelo método de inclusão em parafina, cortes de em 4 μ m de espessura, e coradas com coloração de hematoxilina-eosina (PROTOCOLO EM ANEXO). Além disso, os dados foram colhidos através de anotações da experiência, imagens de câmera fotográfica e imagens de microscopia.

As carcaças, assim como o material descartável utilizado foram encaminhados para incineração.

5.8 APROVAÇÃO PELOS COMITÊS DE ÉTICA:

Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FUNDHACRE, sob o parecer de número 2.790.354, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Acre, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número 91370218.5.0000.5009.

6- RESULTADOS

Dos seis pacientes internados para tratamento da hidatidose no período de coleta, que se realizou entre fevereiro e agosto de 2019, quatro não puderam participar da amostra. Dentre eles, destaca-se um paciente portador do vírus HIV, que foi excluído para evitar o viés de uma imunossupressão nos camundongos e outro que apresentou abscesso hepático, devido a complicações da doença hidática. Os outros pacientes, não apresentavam cistos viáveis em suas amostras.

A figura 6 mostra três protoscóleces das amostras humanas utilizadas, em fases progressivas de maturação, sendo possível visualizar em A e B protoscóleces invaginados e em C, um protoscólece evaginado. Ainda em A, pode-se ver a coroa de ganchos e apenas três corpúsculos calcários, enquanto na figura B, também é possível visualizar a coroa de ganchos e vários corpúsculos calcários. Já em C, observa-se o protoscólece evaginado, com rostelo e ventosas. Neles é possível observar turgidez e integridade de sua morfologia, assim como na maior parte dos protoscóleces da lâmina analisada, que foram os critérios utilizados para a definição de viabilidade dos cistos.

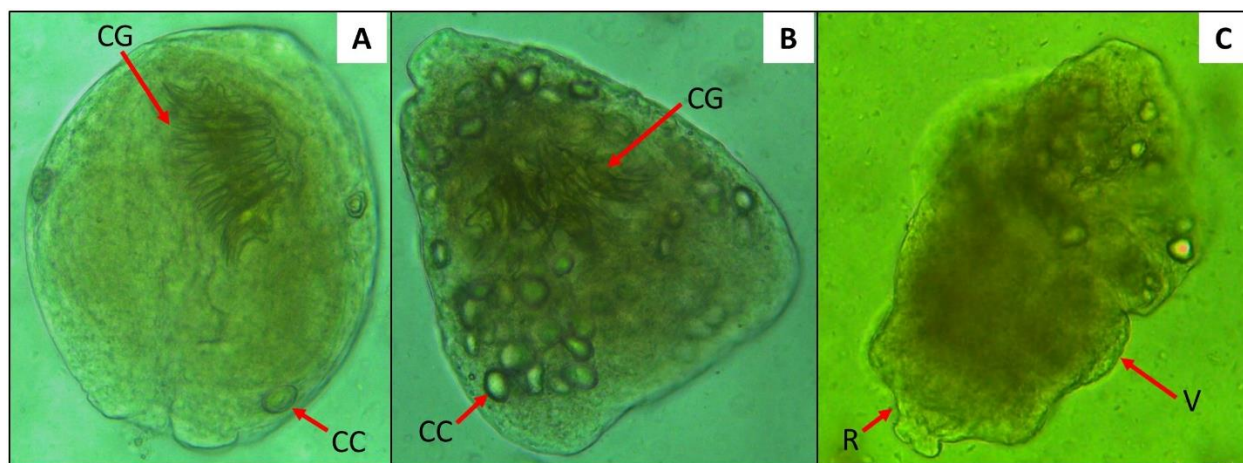


FIGURA 6 – Protoscóleces íntegros das amostras humanas, vistos no aumento de 1000x com coloração de Dibromato de Potássio a 2%. **(A)** Protoscólece invaginado (PSC-I) com coroa de ganchos (CG) e alguns corpúsculos calcários (CC). **(B)**. Protoscólece invaginado (PSC-I) com grande quantidade de corpúsculos calcários (CC). **(C)**. Protoscólece evaginado (PSC-E) com rostelo (R) e ventosas (V) claramente visíveis.

Após a segunda sessão de inoculação, morreram quatro fêmeas e dois machos. Três fêmeas morreram no dia 31 de agosto (15^o dia após a inoculação) e outra no dia 7 de setembro (22^o dia), um macho dia 28 de setembro (43^o dia) e um dia 14 de outubro

(59º dia). Estes foram conservados em solução de formol a 10% para necrópsia nos dias 27 de outubro, quando foram sacrificados os primeiros casais inoculados, contudo, não foram encontrados cistos em suas necrópsias.

Dia 7 de dezembro foi realizado a eutanásia dos camundongos sobreviventes da segunda inoculação, e dos 14 camundongos que permaneceram vivos até o final do experimento, em 13 foram encontrados Cistos Hidáticos contendo PSC íntegros, sendo cinco fêmeas e oito machos (TABELA 1). A partir da amostra inicial de 20 camundongos, houve uma mortalidade de 30%, e nos sobreviventes, 93% com o desfecho esperado.

QUADRO 1. Inventário da cavidade abdominal dos camundongos.

Identificação (*)	Cistos visualizados macroscopicamente	Local dos cistos	Visualização Histológica de protoscóleces viáveis
F0.1	Sim	Peritônio Parietal	Presente
F0.2	Sim	Peritônio Parietal	Presente
F0.3	Não	---	---
F1.1	Sim	Peritônio Parietal e Mesentério	Presente
F1.2	Sim	Mesentério	Presente
F1.3	Sim	Cavidade	Presente
F1.4	Não (óbito)	---	---
F1.5	Não (óbito)	---	---
F1.6	Não (óbito)	---	---
F1.7	Não (óbito)	---	---
M0.1	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M0.2	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M0.3	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.1	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.2	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.3	Sim	Mesentério	Presente
M1.4	Sim	Cavidade Abdominal, Peritônio Parietal, Mesentério e Fígado	Presente
M1.5	Sim	Cavidade Abdominal	Presente
M1.6	Não (óbito)	---	---
M1.7	Não (óbito)	---	---

* A nomenclatura usada para identificação de cada camundongo usa letras e números. F: fêmea; M: macho; 0: camundongos da primeira inoculação; 1.: camundongos da segunda inoculação; os últimos números à direita correspondem à sequência em que foram sacrificados.

A localização dos cistos se deu da seguinte forma: em sete estavam dispersos na cavidade abdominal, quatro no peritônio parietal, quatro no mesentério e um na superfície hepática, sendo que desses, um camundongo possuía concomitantemente cistos no peritônio parietal e mesentério e outro camundongo, na cavidade abdominal, peritônio parietal, mesentério e fígado (Figuras 8 e 9).

A única manifestação física observada pelos pesquisadores nos camundongos, durante o período entre a inoculação e a eutanásia, foi a presença de nódulo endurecido associado à perda de pelos localizado na parede abdominal de duas fêmeas, F01 e F02, (Figura 7). Após a necrópsia, foi verificado que neste local encontravam-se cistos aderidos ao peritônio parietal, não sendo encontrados outros cistos na cavidade abdominal. Após a análise microscópica, foi confirmado serem cistos hidáticos viáveis (Figura 11, letra F). Os outros camundongos, apesar de terem desenvolvido cistos hidáticos, não apresentaram sinais físicos ou comportamentais de doença, seguindo suas atividades diárias normalmente.

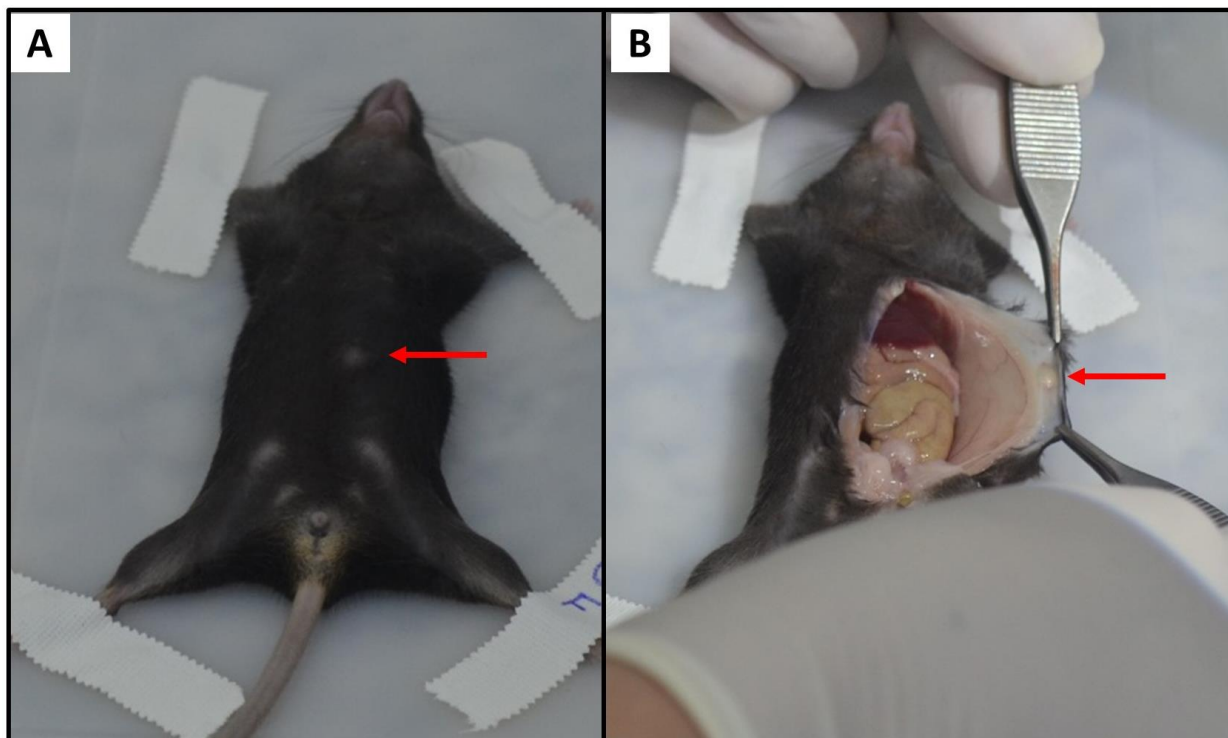


FIGURA 7 – Cisto Hidático no peritônio parietal. (A). Nódulo palpável na parede abdominal associado à perda de pelos na região simulando tumor de parede abdominal. (B). Visão intra-abdominal durante a necrópsia demonstrando cisto hidático em peritônio parietal.

A Figura 8 demonstra a forma de apresentação dos cistos encontrados durante o inventário da cavidade abdominal, também descrito na Quadro 1. Assim, durante a necrópsia, foi possível identificar cistos encapsulados e livres na cavidade abdominal (setas brancas), apresentando coloração que variaram entre transparente, esbranquiçada e amarelo/acastanhada. Também haviam cistos fracamente aderidos aos órgãos adjacentes, como no fígado (C e D) e no mesentério (A).

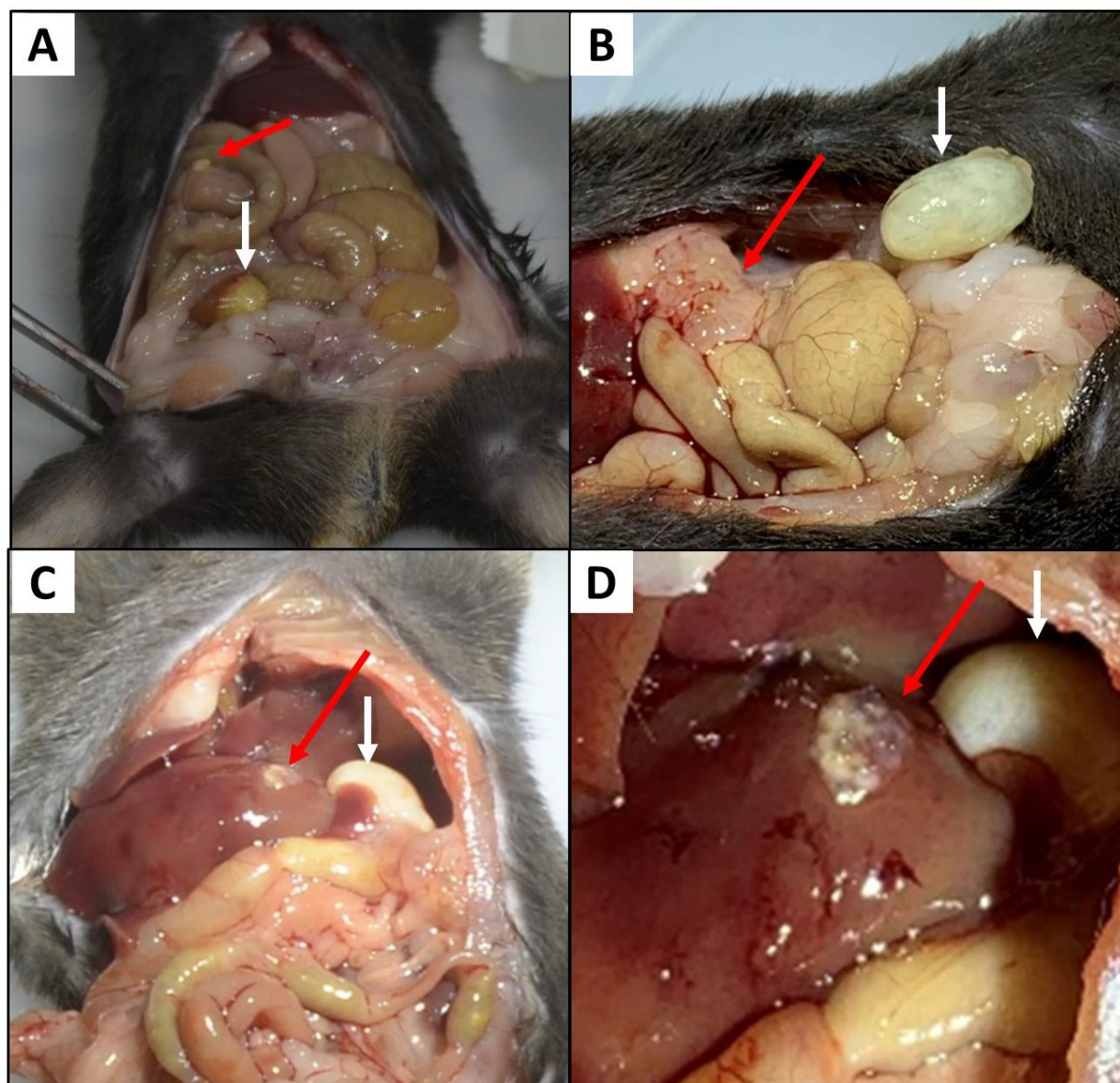


FIGURA 8 – Inventário da cavidade abdominal. Setas vermelhas indicam cistos aderidos aos órgãos adjacentes; Setas brancas mostram a presença de cistos encapsulados e livres na cavidade. (A). Cisto adjacente ao mesentério e encapsulado de coloração amarela/acastanhada e opaca em abdome inferior. (B). Cistos na cavidade abdominal adjacentes aos órgãos do quadrante superior esquerdo. (C) e (D). Cistos aderidos fracamente à capsula hepática.

A figura 9 demonstra a forma de crescimento dos cistos hidáticos encontrados no mesentério de um dos quatro camundongos que apresentaram desenvolvimento de cistos nesta localização (Tabela 1). Os cistos apresentavam-se translúcidos, sem calcificações aparentes e intimamente aderidos aos vasos mesentéricos. Estes tipos de cistos possuíam ainda uma membrana frágil, que se rompia facilmente, ao contrário das formas encapsuladas.

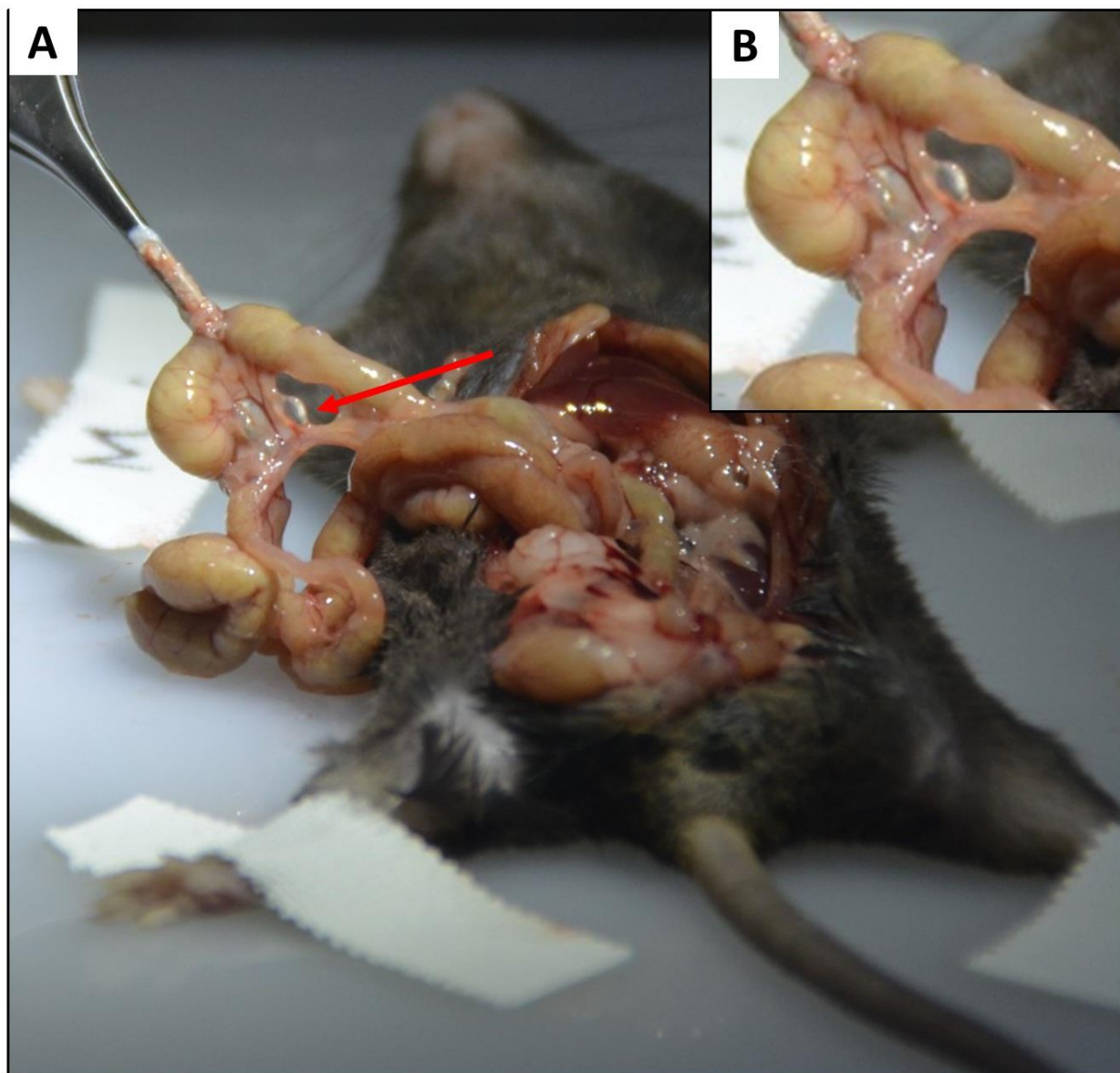


FIGURA 9 - Cistos hidáticos aderidos ao mesentério. (A). Seta vermelha indica vesículas transparente aderidas a vasos mesentéricos. (B) Imagem ampliada dos cistos.

Nas imagens A e B da Figura 10 é possível observar os cistos bastante aderidos à gordura pré-peritoneal e ao próprio peritônio visceral e parietal. Observa-se na imagem B, o peritônio parietal e as vísceras adjacentes aos cistos, apresentando espessamento, edema e vasos dilatados, típicos de processos inflamatórios. Nos cistos já excisados, visualizados na mesma figura, pode-se verificar a heterogeneidade de tamanho, formas e cores, além de sua intrincada adesão ao tecido gorduroso do animal.

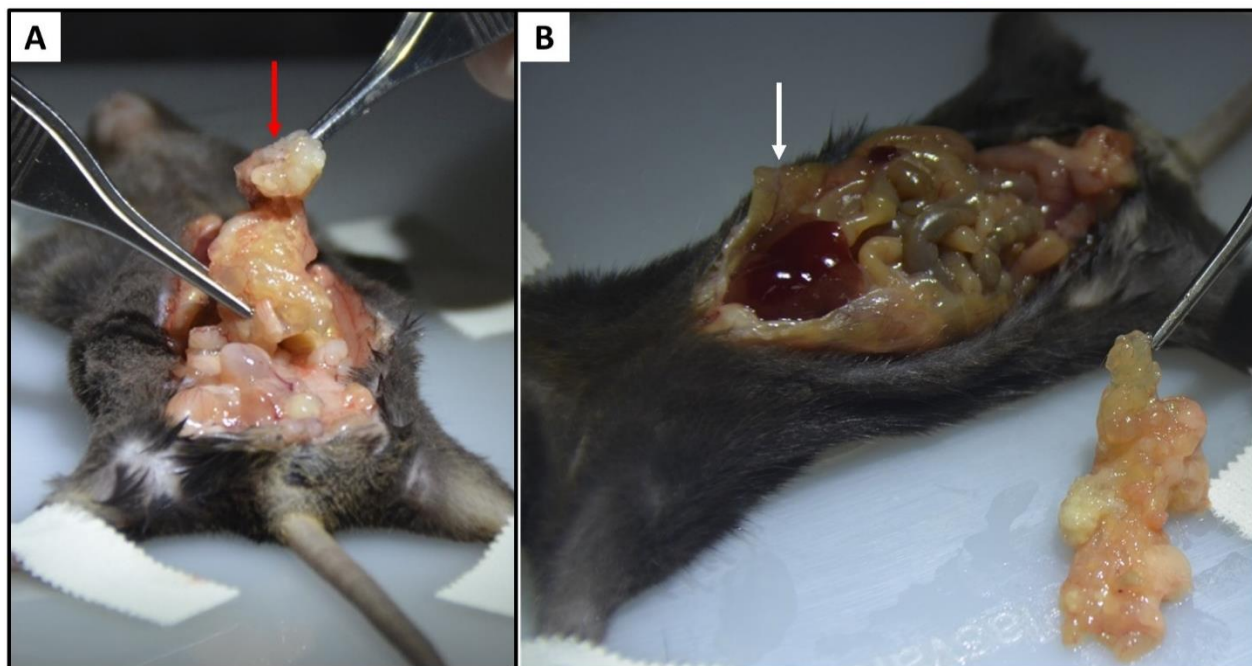


FIGURA 10 – Aderência e reação inflamatória causada pelos cistos hidáticos. (A) Seta vermelha indica cistos fortemente aderidos ao tecido gorduroso extra peritoneal e ao peritônio. (B). Seta branca indicando sinais inflamatórios no tecido pericístico e pinça indicando o tecido excisado em bloco, contendo cistos hidáticos e tecido adiposo.

A Figura 11 traz os principais achados de todas as lâminas analisadas confeccionadas com as amostras de cistos colhidas após as necrópsias dos camundongos. Na lâmina A é possível visualizar um protoscólice invaginado (PSC-I) em corte coronal, aderido à membrana germinativa. É possível também visualizar a coroa de ganchos invaginada e alguns corpúsculos calcários. A foto da lâmina B, tirada no aumento de 1000x, demonstra a forma como são medidos os ganchos do parasita, sendo a medida do comprimento total desde grande gancho igual $45,5\mu\text{m}$ e a largura igual a $12,05\mu\text{m}$.

A lâmina C da Figura 11, também mostra um PSC-I aderido a um tecido fibroso proveniente de reação inflamatória crônica, sem a presença de membrana germinativa ou laminada. Há também presença de hemácias aderidas ao PSC e ao tecido fibroso. A lâmina D demonstra as medidas do mesmo PSC visualizado em C. O PSC-I foi medido em corte transversal no aumento de 400x, apresentando 90,81 μ m em seu maior eixo e 64,26 μ m no menor eixo. Ainda neste corte é possível visualizar a dupla coroa de ganchos, ou seja, a coroa interna e a externa.

Na lâmina E, identifica-se uma Cápsula Prolígera contendo um PSC e grande quantidade de areia hidática. Em F, está em um aumento de 100x, de forma a evidenciar todas as estruturas típicas de um Cisto Hidático, ou seja, a Camada Laminada (CL) de aspecto “cerebroide”, a Camada Germinativa (CG), a Capsula Prolígera (CP) e Protoscóleces (PSC). Além dessas camadas pertencentes ao parasita, nota-se também presença de tecido fibroso com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta branca), representativo da camada adventícia, pertencente ao hospedeiro.

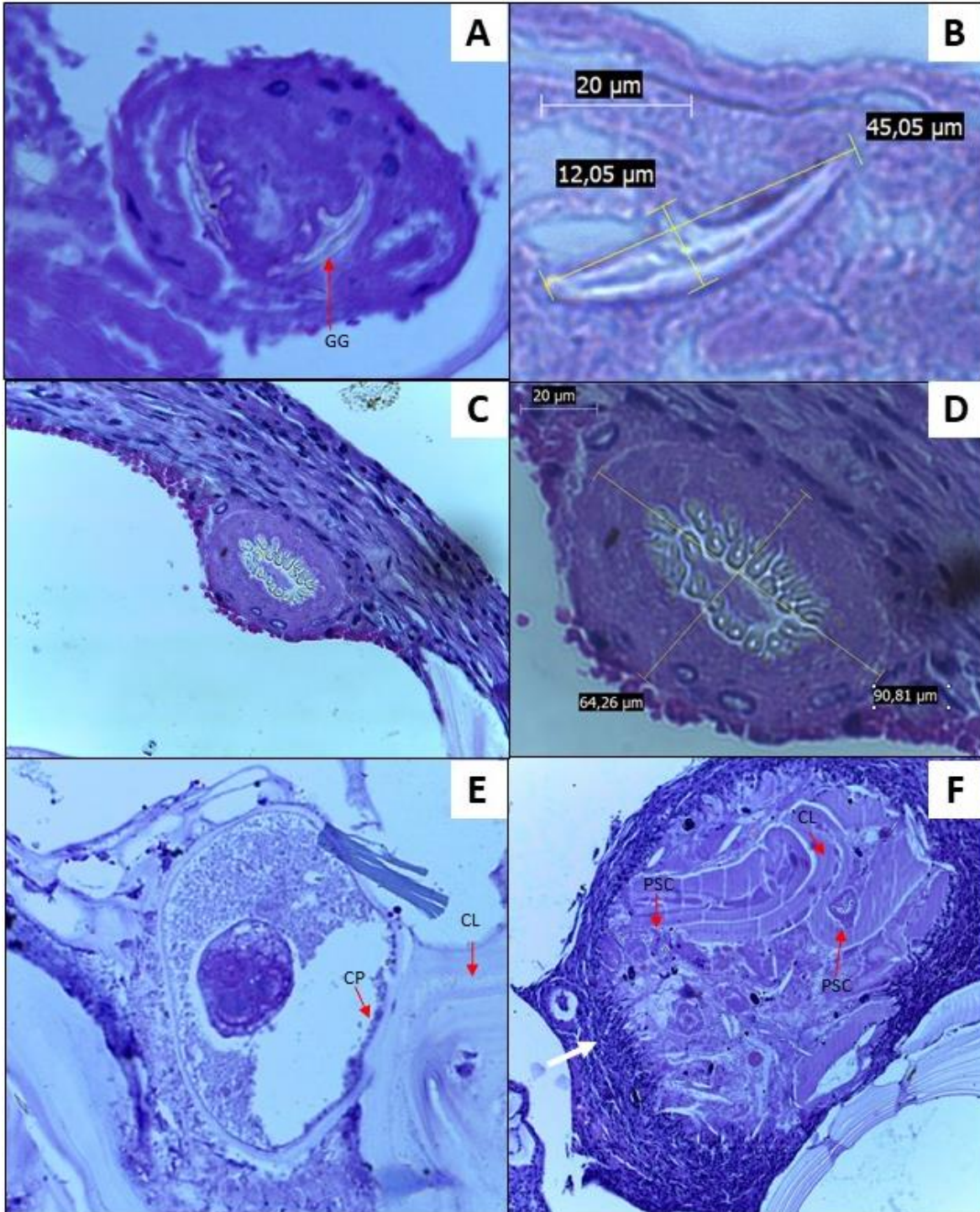


FIGURA 11 – Caracterização histopatológica dos cistos hidáticos de *E. vogeli* através de lâminas em bloco de parafina coradas com HE. (A). Protoscócele invaginado (PSC-I) em corte coronal em aumento de 1000x. (B). Grande gancho medido em micrômetros no aumento de 1000x. (C). Protoscócele (PSC) aderido a um tecido fibroso, sem presença de membrana germinativa ou laminada. Há também presença de hemácias aderidas ao protoscócele (PSC) e ao tecido fibroso. (D). Protoscócele (PSC) em corte transversal medido em micrômetros no aumento de 400x; nota-se a dupla coroa de ganchos. (E). Cápsula Prolígera (CP) com um Protoscócele (PSC). (F). Cisto Hidático composto pela camada laminada ou cuticular externa (CL), camada germinativa (CG), cápsula prolígera (CP) e por protoscócele (PSC); nota-se também presença de tecido fibroso com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (seta branca).

7- DISCUSSÃO

A presença de cistos hialinos disseminados na cavidade peritoneal dos camundongos, somada à visualização de protoscóleces íntegros nas lâminas histológicas, mesmo após os 4 meses da inoculação da amostra de cistos humanos, confirma a eficácia da técnica de cultivo *in vivo* realizada neste trabalho.

Assim como no experimento realizado por Rausch & D'Alessandro (1999), a despeito de terem sido injetados na cavidade peritoneal inferior dos camundongos, durante as necrópsias, foi possível confirmar a disseminação dos cistos para outras regiões do abdome, como por exemplo, na cavidade superior. A ausência de contiguidade entre os cistos, que foram encontrados dispersos na cavidade peritoneal das cobaias, demonstra a vitalidade e a capacidade proliferativa e metastática do parasita.

A formação de metástases é explicada através do brotamento exógeno de pequenas vesículas a partir de vesículas progenitoras maiores, com invasão dos tecidos vizinhos (ECKERT *et al.*, 1983; MEHLHORN *et al.*, 1983; RAUSCH & D'ALESSANDRO, 1999). Essa proliferação depende de fatores de crescimento inerentes ao parasita e da quantidade de insumos metabólicos ofertados pelo corpo do hospedeiro (HEMPHILL E GOTTSTEIN, 1997). Além da metástase por contiguidade, pode ocorrer metástases à distância, em casos de longa duração da doença (RAUSCH & D'ALESSANDRO, 1999).

As duas amostras de cistos colhidas das pacientes possuíam as características macro e microscópicas da Equinococose Policística, ou seja, múltiplos cistos agrupados compostos por uma camada laminada externa espessa e com múltiplas dobras em si mesma, uma camada germinativa e algumas capsulas prolíferas, assim como também descrita por Díaz *et al.* (2011a). Nas amostras dos camundongos também foi possível observar todas as camadas que compõem os cistos, e assim como nas pacientes, foi possível visualizar protoscóleces viáveis em seus vários estágios larvais, comprovando assim o sucesso da infecção.

Sua apresentação bastante variada, em geral, fracamente aderido ao tecido conjuntivo de algum órgão abdominal, seja o peritônio parietal ou visceral, ou no

mesentério, pode sugerir uma preferência do parasita, por infectar tecidos conjuntivos. Porém, algumas vesículas também foram encontradas livres na cavidade, crescendo em pequenos grupos separados ou encapsulados. Estes achados, condizem com as características morfológicas e de crescimento descritas por Ingold et al (2001), na qual, observaram fraca associação entre os cistos e o tecido do hospedeiro.

Macroscopicamente, os cistos hidáticos encontrados nos camundongos, apresentavam vários tamanhos e formas bastante variados, predominando um aglomerado de pequenas vesículas com aproximadamente um milímetro cada, aderidas umas às outras, sendo algumas recobertas por uma membrana hialina e moldada de acordo com o espaço em que ocupavam. Apesar das diferentes apresentações dos cistos, isto não interferiu na vitalidade dos cistos, pois em todas as amostras de cistos colhidos das cobaias, foram encontrados protoscóleces viáveis.

As cores dos cistos variaram entre translúcidos à escurecidos, ou brancos e calcificados. É importante ressaltar que as cores dos cistos estão relacionadas com sua composição (SHANSHAN *et al.*, 2018). Os cistos translúcidos são aqueles que apresentam maior quantidade de protoscóleces viáveis, visto que ainda não sofreram calcificação ou encapsulamento por reação imune do hospedeiro, como é o caso dos cistos mais esbranquiçados. É provável que os cistos que se apresentavam escurecidos, tenham sofrido alguma reação com fluidos do hospedeiro, adquirindo uma coloração acastanhada (SHANSHAN, *et al.*, 2018).

Além disso, através da análise histopatológica dos cistos encontrados nos camundongos, também foi possível identificar várias estruturas típicas do *E. vogeli*, como a membrana laminada de aspecto “cerebroide”, capsulas prolíferas, grandes ganchos com medidas equivalentes aos da espécie e protoscóleces íntegros. A maior parte dos protoscóleces visualizados nas lâminas estavam localizados na camada germinativa interna e não dentro de cápsulas prolíferas. Este achado corrobora com a pesquisa realizada por Ingold et al (2001), no qual os protoscóleces foram vistos surgindo diretamente da camada germinativa, que é interna à camada laminada.

Além de terem sido observadas, nas lâminas analisadas, a proliferação endógena e as várias dobras da membrana laminada, na qual encontravam-se vários protoscóleces

isolados em seu interior, também foi possível visualizar a presença da camada laminada tanto interna quanto externamente ao tecido fibroso inflamatório produzido pelo hospedeiro. Isso sugere a transposição desta barreira imune, visto que a camada laminada visualizada possuía áreas espessas e áreas bastante adelgadas e prostrusas.

O fato de ser comumente uma doença que leva muitos anos para provocar sintomas, em geral inespecíficos, sugere a prevalência de uma imunidade inata não citotóxica (INGOLD *et al.*, 2001). Com exceção do camundongo F1.2, os órgãos adjacentes aos cistos dos outros camundongos, não apresentaram sinais inflamatórios aparentes à visualização macroscópica, como vasodilatação e edema. Apesar da não visualização macroscópica, na avaliação histológica das lâminas, nota-se a presença de reações inflamatórias crônicas, com infiltrados linfoplasmocitários, sugerindo uma reação da imunidade celular nos tecidos afetados pela doença.

O tempo de espera de 4 meses entre a inoculação e a eutanásia foi suficiente para o desenvolvimento de uma resposta imune pelos camundongos, já que em média estes levam 2 semanas para geração de resposta imune específica contra o cestóide (INGOLD *et al.*, 2001). A observação de tecido inflamatório linfoplasmocitário, confirma a presença de resposta da imunidade celular dos camundongos C57BL/6.

É importante lembrar que camada laminada é uma estrutura acelular produzida pelo parasita e que está envolvida na interação física entre o parasita e o hospedeiro e suas reações imunológicas, tanto no sentido de oferecer moléculas de reconhecimento antigênico aos anticorpos do hospedeiro, como na proteção física do metacéstoide (HEMPHILL *et al.*, 2003; INGOLD *et al.*, 2001). O hospedeiro produz a camada adventícia, uma camada fibrosa, proveniente de processos inflamatórios crônicos, como forma de isolar o agente infeccioso e reduzir a progressão da infecção (D'ALESSANDRO, 1997).

A membrana laminada encontrada nos cistos retirados das cobaias, em geral possuía várias dobras em torno de si própria, como se essa membrana estivesse em contínuo crescimento, porém confinada a um espaço restrito, formando assim, com essas dobras, caminhos como “labirintos”, os quais entre essas dobras, eram encontrados protoscólecis isolados e fora da capsula prolígera. Essas dobras da

camada laminada são características do *E. vogeli*, e são conhecidas como apresentando aspecto “cerebroide” (SOARES, 2004).

A presença de cistos viáveis nas amostras analisadas dos pacientes, demonstra que mesmo após vários anos do uso de albendazol, este não foi capaz de matar o parasita e conseqüentemente proporcionar a cura da doença. Isso reforça a importância de se buscar aprimorar os estudos sobre este assunto, de forma a aumentar o conhecimento e o embasamento científico para uma maior segurança e eficácia no tratamento dessa doença, de forma a auxiliar na melhoria do cuidado à saúde dessa população (BRASIL, 2011).

Entre os anos de 1999 e 2019, foram atendidos no ambulatório de Cirurgia Geral do FUNDACRE 217 casos consecutivos dessa doença, com média anual de 11 casos (Dados não publicados). Devido à relativa baixa incidência, comparado a outras doenças, poucos recursos são disponibilizados para o estudo da Equinococose, fazendo jus a sua participação na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (OPAS, 2017). Dessa forma, a busca por novos conhecimentos sobre a Equinococose Policística beneficia principalmente a população da Região Amazônica, onde essa doença encontra maior prevalência (BRASIL, 2011).

Além disso, por não ser uma doença de notificação compulsória nos estados da região amazônica, os registros ficam restritos aos prontuários dos pacientes, dificultando sua análise quantitativa, diminuindo ainda mais a visibilidade da doença pelo sistema de saúde, secundário à falta de dados estatísticos confiáveis. Essa escassez de dados quantitativos sobre a prevalência da doença hidática em nosso país não nos permite compreender sua real importância para o serviço de saúde, no que diz respeito aos aspectos socioeconômicos. Dessa forma, seria importante que a hidatidose policística passasse a ser classificada como doença de notificação obrigatória, para que se possa fazer uma análise da real situação da doença no território nacional.

8- CONCLUSÃO

É possível realizar, com sucesso, a infecção experimental de camundongos C57BL/6J com cepas de *E. vogeli* da região da Amazônia Ocidental a partir da inoculação direta em sua cavidade peritoneal de material hidático de pacientes humanos infectados, mesmo que estes tenham feito uso de albendazol, já que o uso deste não provocou a perda da vitalidade do metacestóide. Com isso, abre-se a possibilidade de realizar replicações desta pesquisa para que se possa investigar terapias mais eficazes para esta doença endêmica.

9- BIBLIOGRAFIA

ALEXIOU, Konstantinos et al. Complications of hydatid cysts of the liver: spiral computed tomography findings. **Gastroenterology research**, v. 5, n. 4, p. 139, 2012.

ALMEIDA, F. et al. Morphometric characteristics of the metacestode Echinococcus vogeli Rausch & Bernstein, 1972 in human infections from the northern region of Brazil, **Journal of helminthology**, v. 89, n. 4, p. 480-486, 2015.

ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; DE OLIVEIRA, Rosilene Santos (Ed.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2006.

BRASIL. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 32, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Hidatidose humana no Brasil: manual de procedimentos técnicos para o diagnóstico parasitológico e imunológico / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde; Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados. Serviço de Referência Nacional em Hidatidose – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 63 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

CHORILLI, Marlus; MICHELIN, Daniel C.; SALGADO, Hérida Regina Nunes. Animais de laboratório: o camundongo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, 2007.

D'ALESSANDRO, Antonio. Polycystic echinococcosis in tropical America: Echinococcus vogeli and E. oligarthrus. **Acta tropica**, v. 67, n. 1-2, p. 43-65, 1997.

D'ALESSANDRO, Antonio; RAUSCH, Robert L. New aspects of neotropical polycystic (Echinococcus vogeli) and unicystic (Echinococcus oligarthrus) echinococcosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 380-401, 2008.

D'ALESSANDRO, A. et al. Echinococcus vogeli in man, with a review of polycystic hydatid disease in Colombia and neighboring countries. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 2, p. 303-317, 1979.

DAMY, Sueli Blanes et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DAVIDSON, Rebecca K. et al. Echinococcus across the north: Current knowledge, future challenges. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 4, p. 39-53, 2016.

DÍAZ, Alvaro et al. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 5, p. 204-213, 2011a.

DÍAZ, Alvaro et al. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 6, p. 264-273, 2011b.

FAGUNDES, Djalma José; TAHA, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FARIAS, Leila Neves et al. Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 153-156, 2004.

FUCCIO, Heloisa; CARVALHO, E. F.; VARGAS, Guillermo. Perfil da caça e dos caçadores no Estado do Acre, Brasil. **Revista Aportes Andinos**, v. 6, p. 1-18, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. **Paris: World Organization for Animal Health and World Health Organization**, p. 20-69, 2001.

GOTTSTEIN, Bruno; D'ALESSANDRO, Antonio; RAUSCH, Robert L. Immunodiagnosis of polycystic hydatid disease/polycystic echinococcosis due to *Echinococcus vogeli*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 5, p. 558-563, 1995.

HEMPHILL, Andrew et al. *In vitro* culture of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus vogeli* metacestodes: studies on the host-parasite interface. **Acta tropica**, v. 85, n. 2, p. 145-155, 2003.

HEMPHILL, Andrew; CROFT, Simon L. Electron microscopy in parasitology. In: **Analytical parasitology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997. p. 227-268.

INGOLD, Katrin et al. Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against in vitro-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1052-1061, 1999.

INGOLD, Katrin et al. Characterization of the laminated layer of *in vitro* cultivated *Echinococcus vogeli* metacestodes. **Journal of parasitology**, v. 87, n. 1, p. 55-64, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Síntese de Indicadores Sociais – SIS 2017**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/multidominio/genero/9221-sintese-de-indicadores-sociais.html>> Acessado em: 23 de dezembro de 2017.

JORGE, Rodrigo Pinto Silva et al. Avaliação do risco de extinção do cachorro-vinagre *Speothos venaticus* (Lund, 1842) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 179-190, 2013.

KERN, Peter et al. WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. **Parasitology International**, v. 55, p. S283-S287, 2006.

LIMA, M. J. et al. APARECIMENTO PRECOCE DE EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL. In: CESAR, Denise Jovê et al. **Saúde da criança e do adolescente: epidemiologia, doenças infecciosas e parasitárias**. / Denise Jovê Cesar... [et.al.] – Rio Branco: Stricto Sensu, 2019. 269 p.: il. DOI: 10.35170/ss.ed.9786580261109

MALDONADO, Lucas L. et al. Revisiting the phylogenetic history of helminths through genomics, the case of the new *Echinococcus oligarthrus* genome. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 708, 2019.

MENEGHELLI, Ulysses G.; MARTINELLI, Ana LC; VELLUDO, Maria AS. Cistos de *Echinococcus vogeli* em fígado de paca (*Cuniculus paca*) originária do Estado do Acre, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 3, p. 153-155, 1990.

MOKS, E. et al. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 647-654, 2008.

MONTÚFAR-VALER, Augudberto; HUAPAYA-JURADO, Francisco L. Características clínicas, radiológicas y laboratoriales de pacientes con hidatidosis hepática en un hospital de referencia nacional, Lima 1997-2010. **Revista de Gastroenterología del Perú**, v. 34, n. 3, p. 203-209, 2014.

MORO, Pedro; SCHANTZ, Peter M. Echinococcosis: a review. **International journal of Infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 125-133, 2009.

NAKAO, M. et al. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**, v. 134, n. 5, p. 713-722, 2006.

SOARES, Manoel do Carmo Pereira et al. Equinococose policística na Amazônia oriental brasileira: atualização da casuística. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 75-83, 2004.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812> Acessado em: 22 de dezembro de 2017.

PACHECO, Gabriel Faria Estivallet; SAAD, Flávia Maria de Oliveira Borges; TREVIZAN, Luciano. Aspectos éticos no uso de animais de produção em experimentação científica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 260-266, 2012.

PACHECO, Sergio et al. Resultados del tratamiento laparoscópico de los quistes hidatídicos hepáticos no complicados. **Revista chilena de cirugía**, v. 69, n. 4, p. 283-288, 2017.

PAIVA, FP de; MAFFILI, Vitor Valério; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. **Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz**, 2005.

PINTO, Pedro Pablo. Diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la hidatidosis. **Revista chilena de cirugía**, v. 69, n. 1, p. 94-98, 2017.

RAUSCH, Robert L.; D'ALESSANDRO, Antonio. Histogenesis in the metacestode of *Echinococcus vogeli* and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease. **The Journal of parasitology**, p. 410-418, 1999.

ROMIG, T. et al. Ecology and life cycle patterns of Echinococcus species. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2017. p. 213-314.

SALÉN, Jörn C. W. Animal models: principles and problems. 1994.

SANTOS, Guilherme B. et al. Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). **International journal for parasitology**, v. 42, n. 13-14, p. 1115-1118, 2012.

SANTOS, Guilherme Brzoskowski et al. Rapid detection of Echinococcus species by a high-resolution melting (HRM) approach. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 327, 2013.

SHANSHAN, Wang et al. The study of biochemical profile of cyst fluid and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in differentiating hepatic hydatid cysts from liver simple cysts. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 32, n. 1, p. e22192, 2018.

SIQUEIRA, Nilton Ghiotti de et al. Polycystic echinococcosis in the state of Acre, Brazil: contribution to patient diagnosis, treatment and prognosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 533-540, 2013.

SOARES, Manoel do Carmo Pereira et al. Anatomico-clinical and molecular description of liver neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus oligarthrus* in human host. **Acta tropica**, v. 125, n. 1, p. 110-114, 2013.

SOARES, Manoel do Carmo Pereira et al. Equinococose policística na Amazônia oriental brasileira: atualização da casuística. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 75-83, 2004.

SPILOTIS, Markus; BREHM, Klaus. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. In: **Host-Pathogen Interactions**. Humana Press, 2009. p. 245-262.

STETTLER, Marianne et al. *Echinococcus multilocularis* alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by *in vitro* drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2256-2262, 2001.

THOMPSON, RC Andrew; LYMBERY, Alan J. ***Echinococcus* and hydatid disease**. Cab International, 1995.

TIEPOLO, L. M.; QUADROS, J.; PITMAN, M. R. P. L. A review of bush dog *Speothos venaticus* (Lund, 1842)(Carnivora, Canidae) occurrences in Paraná state, subtropical Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 444-449, 2016.

VENEGAS, Juan; ESPINOZA, Sandra; SÁNCHEZ, Gittith. Estimación del impacto económico de la equinococosis quística en Chile y análisis de las posibles causas que han dificultado su erradicación. **Revista médica de Chile**, v. 142, n. 8, p. 1023-1033, 2014.

VIZCAYCHIPI, Katherina A. et al. Primera identificación de *Echinococcus vogeli* en una paca en la provincia de Misiones, Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 45, n. 3, p. 169-173, 2013.

WANG, Hui et al. In vitro culture of *Echinococcus multilocularis* producing protoscoleces and mouse infection with the cultured vesicles. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 411, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015**. World Health Organization, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **The control of neglected zoonotic diseases: from advocacy to action: report of the fourth international meeting held at WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 19-20 November 2014**. 2015a.

ZHANG, Wenbao; LI, Jun; MCMANUS, Donald P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 18-36, 2003.

10-ANEXOS

10.1 Coloração de Rotina H.E (Hematoxilina x Eosina)

Fixação: formol a 10%

Técnica: corte a 4 micras

MÉTODO DE COLORAÇÃO:

Desparafinizar e Hidratar:

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| 1- Xilol I | - 20min (10min na estufa) |
| 2- Xilol II | - 20min (10min na estufa) |
| 3- Álcool absoluto | - 2min (ou 10 passadinhas) |
| 4- Álcool 90° | - 2min (ou 10 passadinhas) |
| 5- Álcool 80° | - 2min (ou 10 passadinhas) |
| 6- Água corrente | - 5min |
| 7- Hematoxilina de Harris | - 2min |
| 8- Água corrente | - 5min |
| 9- Álcool 70° | - 2min |
| 10-Eosina | - 30 segundos |
| 11- Álcool absoluto I | - 2min |
| 12- Álcool absoluto II | - 2min |
| 13- Álcool/Xilol | - 2min |
| 14- Xilol I | - 2min |
| 15- Xilol II | - MONTAGEM |

Bateria de HE

Ao montar a bateria de HE faça sempre ida e volta:

Xilol

Xilol

Álcool 1

Álcool 2

Álcool 3

Álcool 4

Álcool 5

Água destilada

Hematoxilina de Grris

Água de torneira

Eosina na carreira de volta

Álcool 1 desidratação

Álcool 2

Álcool 3

Álcool 4

Álcool 5

Xilol

Xilol de montagem



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Comitê de Ética no Uso dos Animais

CERTIFICADO

Certifico que a proposta intitulada “CULTIVO IN VIVO DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO SOBRE A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA AMAZÔNIA OCIDENTAL”, registrada com o número de processo 23107.010629/2018-11 e número de protocolo 22/2018, sob responsabilidade de **Mábia de Jesus Lima** – que envolve a produção manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UFAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, em reunião de 25/10/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/03/2019 até 20/06/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/C57BL/6
Nº de animais	Nº 30
Peso/Idade	17g à 25 g/6 à 8 semanas
Sexo	Macho e Fêmea.
Origem	Biotério da Fiocruz Rondônia.

Soraia L. de Souza
Profa. Dra. Soraia Figueiredo de Souza
Coordenadora CEUA/UFAC
Portaria nº1.620, de 16 de junho de 2017

CEUA
Recebido em:
25/10/2018
Por: Mábia de Jesus Lima

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CULTIVO *IN VIVO* DE CISTOS HIDÁTICOS EM COBAIAS: UM ESTUDO SOBRE A EQUINOCOCOSE POLICÍSTICA NEOTROPICAL NA AMAZÔNIA OCIDENTAL **Pesquisador:** MABIA DE JESUS LIMA **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 91370218.5.0000.5009

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.790.354

Apresentação do Projeto:

O presente projeto trata-se de um estudo experimental de cultivo *in vivo* da forma larvária (metacéstódes) do *Echinococcus vogeli* em cobaias, que se propões a realizar uma avaliação da incidência e a descrição dos cistos hidáticos na população de camundongos, após infecção intraperitoneal. Será medida a prevalência dos desfechos de acordo com as variáveis estudadas e a significância estatística será aferida pelo teste de qui-quadrado de Pearson.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar estudo experimental de cultivo *in vivo* da forma larvária (metacestoides) do *Echinococcus vogeli* em cobaias.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a vitalidade dos protoescólex recuperados nos espécimes cirúrgicos.
- Realizar as medidas dos ganchos rostelares, confirmando a espécie circulante no Estado do Acre.
- Realizar inoculação de suspensão parasitária intraperitonealmente em camundongos, como técnica de cultura *in vivo*, de forma a facilitar estudos posteriores sobre a doença.
- Realizar a necropsia e estudo dos órgãos afetados pela doença hidática policística utilizando as técnicas de eutanásia humanitária proposta pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

- Realizar um estudo detalhado do material hidático amostral, quanto à sua morfologia, macroscópica e microscopicamente.
- Revisar na literatura as principais manifestações clínicas, laboratoriais e radiológicas apresentadas na doença hidática, assim como os principais exames complementares e seus achados, utilizados para a confirmação diagnóstica da doença;
- Descrever as principais formas de tratamento utilizadas para hidatidose na população pesquisada, assim como compará-los e identificar os tratamentos mais efetivos na cura da doença, segundo a literatura atual.
- Comparar o perfil da hidatidose encontrada regionalmente com o perfil nacional e internacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Alguns riscos podem ser indiretos, inerentes à cirurgia, que iria se processar, independentemente da pesquisa e que, portanto, serão explicados na ocasião da indicação da mesma. Para evitar e/ou minimizar os riscos, serão tomadas as providências e precauções com relação ao sigilo da pesquisa evitando exposição do paciente.

Há também o risco de acidente com material orgânico contaminado, que será evitado com o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e utilização de instrumentos e materiais adequados ao manejo do material a ser coletado.

Benefícios:

O benefício esperado com essa pesquisa é a possibilidade de realizar posteriores experimentos cirúrgicos, medicamentosos e preventivos, como a criação de novas vacinas para os animais domésticos e até mesmo para humanos. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado como resultado da pesquisa, mas poderão contribuir para o avanço científico e tratamento de outras pessoas com a mesma doença posteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é uma pesquisa relevante. Os resultados podem proporcionar resultados importantes para o avanço científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória encontram-se adequados.

Recomendações:

Não há. A pesquisa encontra-se dentro dos padrões científicos e metodológicos com estrutura coerente aos objetivos apresentados, atendendo os critérios estabelecidos pela Resolução 466/2012 do CNS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela análise precedida por este Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. As alterações e complementações em relação a esse protocolo foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme item XI.1, do Capítulo XI, da Resolução CNS nº 466/2012, a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais. Portanto, cabe ao pesquisador responsável:

- Desenvolver o projeto conforme delineado;
- Elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- Apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1142944.pdf	12/06/2018 15:59:53		Aceito
Outros	termoautorizacao3.pdf	12/06/2018 15:58:08	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito
Outros	declaracaoiniciacao3.pdf	12/06/2018 15:56:38	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito
Outros	termocompromisso3.pdf	12/06/2018 15:55:46	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito
Outros	cartaencaminhamento3.pdf	12/06/2018	MABIA DE JESUS	Aceito

Outros	cartaencaminhamento3.pdf	15:54:46	LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle3.pdf	12/06/2018 15:51:47	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOESCANADA.pdf	23/05/2018 23:27:18	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOHIDATIDOSEEXPERIMENTA L.docx	23/05/2018 22:43:45	MABIA DE JESUS LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO BRANCO, 30 de Julho de 2018

**Assinado por:
Maria José Lucas Mortari
(Coordenador)**

