UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Cryptosporidium parvum: estabelecimento de modelo experimental em
camundongo imunossuprimido com dexametasona

Matheus Diniz Gonçalves Coêlho

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Hermínia Yohko Kanamura

**São Paulo
2004**

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Cryptosporidium parvum: estabelecimento de modelo experimental em
camundongo imunossuprimido com dexametasona

Matheus Diniz Gonçalves Coêlho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100006172

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Coelho, Matheus Diniz Gonçalves
C672c *Cryptosporidium parvum*: estabelecimento de modelo
experimental em camundongo imunossuprimido com
dexametasona / Matheus Diniz Gonçalves Coelho. -- São
Paulo, 2004.
57p.
Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Kanamura, Hermínia Yohko
1. Parasitologia 2. Imunologia 3. Protozoa : Zoologia
4. Antiinflamatório I. T. II. Kanamura, Hermínia Yohko,
orientador.

616.96 CDD

Matheus Diniz Gonçalves Coêlho

Cryptosporidium parvum: estabelecimento de modelo experimental em
camundongo imunossuprimido com dexametasona

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^ª Dr^ª Herminia Yohko Kanamura
Orientador/Presidente

Prof^ª Dr^ª Irene da Silva Soares
1^º examinador

Prof^ª Dr^ª Solange Maria Gennari
2^º examinador

São Paulo, 27 de Agosto de 2004.

Longos são os caminhos e curtos são
os passos, mas de que seriam os
séculos, se não fossem os segundos...
de que seriam as grandes
descobertas se não fossem os
pequenos achados, de que seriam as
grandes construções se não fosse
cada tijolo lá colocado...
regozijemo-nos pois em cultivar
uma semente, visto que, por menor
que seja, poderá gerar uma grande
árvore, e frutificar.

Matheus Coêlho

Dedico este trabalho

*a meu pai, Heitor Gonçalves Coêlho, porque
foi mais do que um pai para mim, me
incentivando a caminhar sempre à frente e a
seguir seu exemplo*

*à minha mãe Eunice Diniz Coêlho, "in
memoriam" por ter sido um exemplo
incomparável de mãe e ter me doutrinado da
maneira que o fez*

*a meu irmão Thiago Diniz Gonçalves Coêlho,
por ter me incentivado a enxergar o caminho
da ciência*

*à Iara Bezerra Rodrigues Coelho por ter me
incentivado a ter paciência*

*à minha amada esposa Francine Alves da
Silva Coêlho, por ter me apoiado de todas as
maneiras possíveis, sendo minha fiel
companheira de todos os momentos e ter me
ajudado em tantas ocasiões, durante a
execução do mestrado*

**Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia da
Universidade de Taubaté e na Seção de
Enteroparasitoses do Serviço de Parasitologia da
Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de
São Paulo, SP.**

**Apoio Financeiro:
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP).**

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Herminia Yohko Kanamura, por ter se disposto a me orientar em um difícil momento do Mestrado e ter compartilhado dos seus conhecimentos e experiência de vida;

À Profª Drª Ana Júlia Urias dos Santos pela amizade e apreço que sei que tem por mim, por ter praticamente me co-orientado durante todo este período e pelo inquestionável apoio científico, emocional e profissional;

Ao professor Heitor Gonçalves Coelho, por ter me apoiado e incentivado desde o início do Mestrado;

À bióloga Francine Alves da Silva Coêlho, por todo o seu apoio fundamental no decorrer de todas as etapas do Mestrado;

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da Silva Pinto, pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação e por ter compartilhado dos seus conhecimentos teóricos e práticos sobre vários aspectos que foram abordados nos experimentos que realizei;

À Profª Drª Maria Helena de Arruda Leme, pelo auxílio na realização dos testes estatísticos;

À Profª Drª Irene da Silva Soares pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação;

À Profª Drª Raquel dos Anjos Fazioli, pela paciência e auxílio na realização de algumas etapas do projeto;

À Profª Drª Elizabeth Natal de Gaspari, por ter indiretamente me ajudado a encontrar o caminho certo para minha realização acadêmica, posto que pude passar a desfrutar do prazer de estudar Parasitologia, em particular *Cryptosporidium parvum*;

Ao Mestre José Márcio Cardoso, pela grande assistência quando da obtenção do tão esperado bezerro infectado para isolamento do inóculo inicial – o começo de tudo;

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Jorge Alves Lima e Elaine Midori Ychico, por todo o auxílio e apoio prestados no decorrer do mestrado;

Ao meu amigo Otávio Ricardo de Oliveira, pelo incentivo constante e compartilhamento da indignação, como o pão de cada dia;

Aos meus colegas de Pós-graduação: Angélica, Sílvia, Edward e Claudinho, por terem compartilhado experiências e conhecimentos durante todo este período;

Aos estagiários, alunos de pós-graduação e funcionários das seções de Imunologia (Teresinha, Ana Patrícia, Lígia, Elza e Aline) e Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (Ivete, Jefferson, Otávio e Fábio) pelo constante incentivo;

Aos estagiários do Laboratório de Parasitologia da UNITAU, em especial à Priscila Figueira Miranda, Wilsa Renata Soares, Eliane de Carvalho Lopes e Juliana Guimarães Cardoso pelo auxílio prestados na realização de alguns experimentos;

Aos funcionários da UNITAU que me incentivaram a seguir em frente na realização desse mestrado e a todos os técnicos, funcionários, alunos, estagiários, enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desse trabalho;

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	I
Lista de Tabelas e Figuras	II
Resumo	IV
Abstract	V
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais da criptosporidiose	01
1.2. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium parvum</i>	02
1.3. Aspectos clínicos da criptosporidiose	03
1.4. Aspectos epidemiológicos da criptosporidiose	03
1.5. Tratamento da criptosporidiose	05
1.6. Resposta imune ao <i>Cryptosporidium</i>	06
1.6.1. Participação dos linfócitos TCD4+ na resposta imune a <i>Cryptosporidium</i> spp via IFN- γ	07
1.6.2. Participação de outras citocinas na resposta imune a <i>Cryptosporidium</i>	08
1.7. Modelos experimentais	11
1.7.1. Cultivo "in vitro"	11
1.7.2. Modelos "in vivo"	12
1.7.2.1. Modelo bovino: bezerros recém-nascidos	12
1.7.2.2. Modelo primata	12
1.7.2.3. Modelo suíno	13
1.7.2.4. Modelo murino	13
1.8. Modelo murino imunossuprimido com glicocorticóides	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Imunossupressão dos camundongos	21

4.1.1. Avaliação da imunossupressão	22
4.1.2. Manutenção de camundongos imunossuprimidos	23
4.2. Obtenção de <i>Cryptosporidium parvum</i> a partir de bezerro	23
4.2.1. Purificação de oocistos e preparação do inoculo para infecção dos camundongos	24
4.3. Infecção de camundongos e coleta dos oocistos	24
4.3.1. Acompanhamento da infecção dos camundongos	26
4.3.2. Recuperação de oocistos das fezes dos camundongos infectados	26
4.3.3. Quantificação dos oocistos de <i>C. parvum</i> recuperados das fezes dos camundongos infectados	27
4.3.4. Manutenção da cepa de <i>C. parvum</i> isolada	27
4.4. Análise estatística	28
 5. RESULTADOS	 29
5.1. Avaliação da imunossupressão dos camundongos	29
5.2. Quantificação dos oocistos recuperados de camundongos infectados	35
5.3. Manutenção da cepa de <i>C. parvum</i> em camundongo	38
 6. DISCUSSÃO	 40
 7. CONCLUSÕES	 44
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 45
 ANEXOS	 58

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IFN- γ – interferon gamma

IL – interleucina

IEL – linfócitos intra epiteliais

TCR – receptor de célula T

TNF- α - fator de necrose tumoral alpha

células NK – células Natural Killer

SIV – Simians Immunodeficiency Virus

A.I. – Antes da imunossupressão

VA – Valor Absoluto

VR – Valor Relativo

mg – miligrama

mL – mililitro

μ L – microlitro

M – Molaridade

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Número de leucócitos/mm³ de sangue de camundongos, expressos em medianas: Grupo A - 20 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 1,0mg de dexametasona; Grupo B - 10 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona e C - 10 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona 30

Tabela 1. Resultados do leucograma do sangue periférico de 20 camundongos BALB/c fêmeas (grupo A) submetidas à imunossupressão com dose diária de 1 mG de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira, segunda e terceira semana da imunossupressão 32

Tabela 2. Resultados do leucograma do sangue periférico de 10 camundongos BALB/c fêmeas (grupo B) submetidas à imunossupressão com dose diária de 0,5 mG de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira, segunda e terceira semana da imunossupressão 33

Tabela 3. Resultados de leucograma do sangue periférico de 10 camundongos C57BL/6 machos (grupo C) submetidos à imunossupressão com dose diária de 0,5 mG de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira e segunda semana da imunossupressão 34

Figura 2. Número total de oocistos, expressos em média aritmética, recuperados a partir das fezes de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5mg de dexametasona (grupo 3), até o 17º dia da infecção 35

Quadro 1. Resumo dos procedimentos de imunossupressão e infecção realizados e do dia de óbito dos animais 36

Tabela 4. Número de oocistos de *C. parvum* recuperados das fezes de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5 mg de dexametasona, do 1º ao 29º dia do experimento 37

Figura 3. Número total de oocistos inoculados e número total de oocistos recuperados do grupo 3 (10 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona e inoculados com 2×10^4 oocistos de *Cryptosporidium parvum*) 38

Figura 4. Número total de oocistos inoculados e número total de oocistos recuperados do grupo 11 (5 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona e inoculados com 2×10^4 oocistos de *Cryptosporidium parvum* recuperados dos camundongos do grupo 3) 39

RESUMO

Estudou-se no presente trabalho a susceptibilidade de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c à infecção por *Cryptosporidium parvum*, com o intuito de se estabelecer modelo animal para obtenção de massa de oocistos. Para isto os camundongos foram submetidos a procedimento de imunossupressão com o corticosteroide dexametasona em diferentes doses, pela via subcutânea e, após estabelecida a imunossupressão, infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* pela via intragástrica. Apenas os camundongos da linhagem C57BL/6, que foram imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona por animal, liberaram uma apreciável quantidade de oocistos nas fezes, sendo deste modo considerados como um modelo simples e prático para amplificação deste parasito.

ABSTRACT

BALB/c and C57BL/6N mice were evaluated for susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection with the purpose of establishing an animal model for obtaining large amount of oocysts. For this, mice were immunosuppressed by subcutaneous application, with different doses of the corticosteroid dexamethasone, and after establishment of the immunosuppression, they were inoculated, by intra-gastric route, with 2×10^4 *C. parvum* oocysts. Only C57BL/6 mice, which were immunosuppressed with 0,5 mg of dexamethasone, released a substantial amount of oocysts in feces, showing that this can constitute a simple and feasible model for amplification of this parasite.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da criptosporidiose

Em 1907, Tyzzer fez a primeira referência ao gênero *Cryptosporidium* para um protozoário parasito que comumente observava nas glândulas gástricas de camundongos. Em 1912, o mesmo pesquisador sugeriu uma nova espécie, *Cryptosporidium parvum*, para um organismo semelhante que passou a observar no intestino de camundongos. Este protozoário parecia ser raro, permanecendo sem importância médico-veterinária por cerca de 40 anos, até que foi responsabilizado por surtos de diarreias em bezeros e, com o advento da AIDS, reconhecido como importante patógeno oportunista (SLAVIN, 1955; PANCIERA *et al.*, 1971; PETERSEN, 1992).

Cryptosporidium spp são protozoários coccídeos que infectam as células epiteliais dos tratos digestivo e respiratório de uma grande variedade de animais vertebrados, sendo parasitos intracelulares obrigatórios. Várias espécies morfológicamente similares foram descritas e nomeadas segundo o hospedeiro em que foram encontradas, no entanto para se identificar e nomear espécies, faz-se necessária uma combinação de métodos morfológicos, biológicos e genéticos (ZU *et al.*, 1992; FAYER *et al.*, 2000; EGYED *et al.*, 2003).

Com relação a *C. parvum*, análises genotípicas de isolados, de humanos e de animais, revelaram a existência de dois diferentes subgrupos genéticos (AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1995; WIDMER *et al.*, 1998). Este fato foi primeiramente comprovado por PENG *et al.* (1997) que, ao estudarem 39 isolados de *C. parvum* de humanos e bovinos, demonstraram a existência de um polimorfismo genético, pela análise molecular de uma região de 369 pares de base do gene que codifica para uma proteína de adesão relacionada a trombospodina (TRAP-C2), definindo deste modo dois genótipos distintos: o genótipo 1, encontrado exclusivamente em infecções humanas, e o genótipo 2, presente tanto em hospedeiros humanos quanto em animais. Ao realizarem testes de infecção experimental, os autores observaram que os isolados do genótipo 1 não foram capazes de infectar camundongos recém nascidos das linhagens

BALB/c e SCID ou bezerros neonatos, ao contrário dos isolados do genótipo 2; devido a diferenças genótípicas, fenotípicas, epidemiológicas e patogênicas entre esses dois genótipos, MORGAN *et al.* (2002) propuseram a denominação *Cryptosporidium hominis* ao genótipo 1, considerando-o assim uma nova espécie.

Revisões bibliográficas recentes reconhecem 13 espécies, a saber: *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. galli*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. molnari*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. saurophilum*, *C. serpentis* e *C. wairi*, previamente diferenciadas com o uso de critérios morfológicos, moleculares e especificidade de hospedeiros (MONIS & THOMPSON, 2003; XIAO *et al.*, 2004).

1.2. Ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*

Nos mamíferos, quando oocistos de *Cryptosporidium* spp. são ingeridos, a excitação ocorre no intestino delgado com liberação de quatro esporozoítos que penetram as vilosidades dos enterócitos, e se desenvolvem no vacúolo citoplasmático, um compartimento extracitoplasmático que permite que o parasito se localize numa região intracelular e extracitoplasmática. No vacúolo, os esporozoítos se desenvolvem em trofozoítos e estes originam o meronte tipo I, que são formas com seis a oito núcleos, que por sua vez produzem seis a oito merozoítos que invadem as células epiteliais adjacentes e se desenvolvem em novos merontes tipo I, que são uma fonte interna de auto-infecção com amplificação do parasito. Uma população de merozoítos origina o meronte tipo II que se desenvolve em microgamonte ou macrogamonte com liberação dos microgametas e macrogametas. A reprodução sexuada inicia-se quando microgametas maduros se fundem com macrogametas, originando após fertilização o zigoto que pode se desenvolver em duas populações de oocistos: os de parede delgada (aproximadamente 20% dos oocistos formados), que são uma segunda fonte de auto-infecção interna, ou oocistos de parede espessa (aproximadamente 80% dos oocistos formados), que podem ser excretados no meio ambiente (KOSEC *et al.*, 2001).

1.3. Aspectos clínicos da criptosporidiose

Os sintomas clínicos da criptosporidiose são amplamente dependentes do hospedeiro. Três populações de hospedeiros têm sido descritas: indivíduos em surtos de áreas industrializadas, crianças de áreas tropicais em desenvolvimento e pacientes imunocomprometidos. Dados de surtos nos Estados Unidos descrevem um período de latência de uma semana após infecção e uma doença caracterizada por diarreia aquosa, ocasionalmente com dores abdominais, náuseas, vômito, perda de peso ou febre moderada, podendo durar até nove dias. Este mesmo quadro clínico é observado em crianças com criptosporidiose nas áreas em desenvolvimento. Já em pacientes imunocomprometidos, a criptosporidiose pode se manifestar de quatro maneiras: a) infecção autolimitada com dores abdominais, náuseas, vômito, perda de peso ou febre moderada; b) síndrome da desidratação diarreica aguda, com 20 ou mais evacuações diarreicas por dia; c) síndrome da diarreia crônica e d) diarreia com envolvimento sintomático dos ductos biliares e pancreáticos (TAGHI-KILANI *et al.*, 1990; MORGAN *et al.*, 1995; LAURENT *et al.*, 1997; FRANZEN & MULLER, 1999; KOSEC *et al.*, 2001).

1.4. Aspectos epidemiológicos da criptosporidiose

Apesar do gênero *Cryptosporidium* ter sido descoberto em 1907, a maioria das informações sobre sua biologia, infecções em humanos e epidemiologia foi acumulada apenas na última década. Nesse período, *Cryptosporidium parvum* passou a ser reconhecido como uma causa comum de diarreia tanto em humanos como em outros animais (TZIPORI & WARD, 2002b; PENG *et al.*, 2003).

Fatores determinantes da epidemiologia e da ocorrência de infecções por *Cryptosporidium parvum* relacionam-se ao seu pequeno tamanho, que dificulta o seu diagnóstico, à baixa dose infectante, à resistência aos procedimentos de cloração utilizados no tratamento convencional de água e ao potencial zoonótico (KOSEC *et al.*, 2001).

A transmissão da criptosporidiose pode ocorrer por contato direto entre humanos e destes com animais infectados e por consumo de água potável ou

contato com água recreacional contaminada; no entanto, a transmissão também pode se dar pelo consumo de alimentos contaminados e possivelmente pelo ar, sendo considerados grupos de risco: crianças, pessoas mal-nutridas e indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), transplantados, pacientes submetidos à quimioterapia para câncer, pacientes institucionalizados e pacientes com doenças infecciosas imunossupressoras (AWAD-EL-KARIEM *et al.*, 1995; FAYER *et al.*, 2000).

Em 1976, os primeiros dois casos de criptosporidiose humana foram relatados por dois grupos independentes e em 1981, foi relatado o primeiro caso de criptosporidiose em paciente com AIDS (FRANZEN & MULLER, 1999). Um ano depois a epidemia de AIDS deu à criptosporidiose humana um novo significado, quando, nos EUA, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention do National Center for Infectious Diseases) relatou que de um total de 21 pacientes com AIDS, 14 desenvolveram um quadro diarréico fulminante e evoluíram ao óbito (PETERSEN, 1992).

Desde então, um grande número de pesquisadores vem investigando a prevalência e epidemiologia dessa infecção em pacientes com AIDS, apresentando resultados estimativos que diferem marcadamente de acordo com a população estudada, com uma frequência média de 32%; porém sabe-se que pacientes com imunodepressão mais severa têm uma maior predisposição a adquirir criptosporidiose (HUNTER & NICHOLS, 2002).

O primeiro surto de infecção por parasito do gênero *Cryptosporidium*, identificado na época como *C. parvum*, através de métodos sorológicos e parasitológicos, se deu no verão de 1984 em Braun Station, um subúrbio com cerca de 5900 pessoas a 32 Km de Santo Antônio, Texas. Porém, o surto de maior repercussão ocorreu em 1993 na cidade de Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos, no qual 403.000 pessoas, de um total de 1.610.000, desenvolveram criptosporidiose devido ao consumo de água contaminada do reservatório da cidade (FRANZEN & MULLER, 1999; DILLINGHAM *et al.*, 2002).

Em estudos conduzidos em países em desenvolvimento como, por exemplo, Nigéria, México, Peru, Guiné-Bissau e Uganda, foi demonstrada a importância de parasitos do gênero *Cryptosporidium* como freqüente causador de diarreia,

relacionando a elevada ocorrência a fatores clínicos, ambientais, higiênicos e nutricionais (OKAFOR & OKUNJI, 1996; ENRIQUEZ, *et al.*, 1997; CHECKLEY *et al.*, 1997; PERCH *et al.*, 2001; TUMWINE *et al.*, 2003).

HOJLYING *et al.* (1986) realizaram um estudo com 374 crianças liberianas, com idades de 6 a 59 meses, com o intuito de investigar o papel de *Cryptosporidium* spp como agente etiológico de diarreia, e verificaram uma ocorrência de 8,4% em crianças com diarreia no ambiente doméstico e 14,6% em crianças hospitalizadas; a aglomeração populacional e a alimentação de recém-nascidos com leite não materno foram considerados os principais fatores de risco para contrair criptosporidiose nessa comunidade.

Em estudo epidemiológico realizado em um hospital próximo a cidade de Jerusalém, Israel, SALLON *et al.* (1988), ao realizarem exame parasitológico de fezes de 221 crianças com diarreia, demonstraram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp em 13% das amostras analisadas; a maioria das crianças com criptosporidiose eram significativamente mais desnutridas do que as crianças que não liberavam oocistos nas fezes. Sendo assim, os autores concluíram que, nos países em desenvolvimento, a elevada prevalência de criptosporidiose em crianças com diarreia estaria associada com a desnutrição.

No Brasil, Mangini *et al.* (1992) demonstraram uma incidência de 17,43% de criptosporidiose em crianças de 0 à 4 anos de idade com quadro de diarreia e internadas no Hospital das Clínicas em São Paulo. Surtos de criptosporidiose também foram observados em outros estados do Brasil, com incidências variando de 72%, em crianças com diarreia, na cidade de Fortaleza – Ceará (Agnew *et al.*, 1998), até 1,1% em crianças, com menos de 5 anos de idade, na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul (Oshiro *et al.*, 2000).

1.5. Tratamento da criptosporidiose

A falta de tratamento efetivo na infecção causada por parasitos do gênero *Cryptosporidium* frequentemente contribui para a morte de pacientes com AIDS ou com imunodeficiências de outras etiologias (WOODS *et al.*, 1996). Observa-se

pouco avanço neste sentido, em parte devido à falta de um modelo de infecção "in vivo" e "in vitro" bem definido (BJORNEBY *et al.*, 1991; MEAD, 2002).

Têm-se estudado vários esquemas de terapia para criptosporidiose tais como: imunoterapia com anticorpos policlonais ou monoclonais (ARROWOOD *et al.*, 1989; DOYLE *et al.*, 1993; RIGGS *et al.*, 2002), terapia com agentes antimicrobianos (HEALEY *et al.*, 1995; WOODS *et al.*, 1996, BLAGBURN *et al.*, 1998), uso de microorganismos da microflora intestinal (WATERS *et al.*, 1999) e terapia com colostro imune bovino (PERRYMAN *et al.*, 1999), algumas delas se mostrando eficazes no controle da criptosporidiose, mas não no estabelecimento da cura definitiva.

O uso de terapia anti-retroviral tem resultado em um decréscimo de infecções oportunistas em pacientes com AIDS nos últimos anos; IVES *et al.* (2001) demonstraram que a incidência de criptosporidiose diminuiu cerca de 60% em pacientes infectados pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus) durante o uso dos coquetéis de drogas anti-retrovirais. No entanto, segundo MEAD (2002), não se sabe ao certo até que ponto este tratamento será efetivo, devido a possibilidade de recombinação viral, o que anularia o efeito da terapia anti-retroviral, resultando numa maior pré-disposição dos pacientes às infecções oportunistas.

1.6. Resposta imune ao *Cryptosporidium*

Tanto em estudos realizados em humanos quanto em estudos com modelos experimentais é ressaltada a importância da resposta imune humoral e celular para atenuar ou resolver a infecção causada por *Cryptosporidium parvum*. Atualmente existe certo consenso de que os dois componentes fundamentais para prevenção ou resolução da criptosporidiose são a citocina interferon gamma (IFN- γ) e os linfócitos T CD4+ (HAYWARD *et al.*, 2000; HUNTER & NICHOLS, 2002; LACRÓIX-LAMANDÉ, 2002).

1.6.1. Participação dos linfócitos T CD4+ na resposta imune à *Cryptosporidium* spp, via IFN- γ

BLANSHARD *et al.* (1992), ao analisarem a contagem de linfócitos T CD4+ em pacientes com AIDS e criptosporidiose, demonstraram que só os pacientes com contagem de linfócitos TCD4+ inferior a 50 células/mm³ de sangue apresentaram doença fulminante; segundo CHEN *et al.* (1993) esta pequena quantidade de linfócitos T CD4+ provavelmente leva a uma diminuição na habilidade destes pacientes de resistirem ou se curarem de uma infecção por *Cryptosporidium* spp. Da mesma maneira, estudos com camundongos comprovam a hipótese de que os linfócitos T CD4+ são de grande importância no estabelecimento de resistência a criptosporidiose neste modelo experimental (BLANSHARD *et al.*, 1992; HAYWARD *et al.*, 2000; LAURENT *et al.*, 2002).

Para delinear a importância das células T CD4+ e da citocina IFN- γ na imunidade protetora em camundongos, UNGAR *et al.* (1986) iniciaram uma série de experimentos nos quais anticorpos monoclonais (Mab) anti-CD4 e anti-IFN- γ foram administrados a camundongos BALB/c recém-nascidos e imunocompetentes infectados com *C. parvum*. Neste estudo demonstrou-se que a co-administração de Mab anti-CD4+ e anti-IFN- γ resultaram numa infecção crônica por *C. parvum*, com grande número de oocistos liberados nas fezes. A remoção do Mab anti-IFN- γ em qualquer ponto do experimento levou a redução do número de oocistos liberados. Por outro lado, para que se mantivesse uma liberação crônica de oocistos houve a necessidade de se manter o tratamento com Mab anti-CD4+. Partindo destes resultados os autores concluíram que IFN- γ limita a severidade da infecção mas não é responsável pela resolução final, sugerindo haver outros mecanismos dependentes das células T CD4+ na cura definitiva da criptosporidiose.

AGUIRRE *et al.* (1994) ao analisarem a susceptibilidade de camundongos deficientes de moléculas MHC-classe I e MHC-classe II, demonstraram que só os camundongos deficientes de MHC-classe II são susceptíveis à infecção por *C. parvum*, já que desenvolveram infecção crônica pelo parasito. Estes camundongos possuíam quantidades de linfócitos B e linfócitos T CD8+ normais, e a criptosporidiose persistente observada foi atribuída a deficiência de linfócitos T CD4+ funcionais no timo, baço e linfonodos dos animais.

Com o intuito de determinar a competência de camundongos de se curarem de criptosporidiose na total ausência de IFN- γ , THEODOS *et al.* (1997) realizaram estudo utilizando camundongos da linhagem C57BL/6, com uma disfunção no gene do IFN- γ (camundongos nocauteados de IFN- γ). Neste estudo também foram analisados camundongos C57BL/6 com uma neutralização temporária da atividade do IFN- γ , obtida pelo uso de anticorpos anti-IFN- γ . Esses pesquisadores demonstraram que, enquanto a neutralização temporária da atividade do IFN- γ induziu uma criptosporidiose apenas temporária, na sua completa ausência os camundongos não foram capazes de se curar.

MEAD & YOU (1998) demonstraram haver uma marcante diferença de susceptibilidade entre as linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c, quando nocauteados de IFN- γ . Ao inocularem camundongos adultos (com 8 a 10 semanas de idade), fêmeas, das duas linhagens, com 10^5 oocistos de *C. parvum* demonstraram que a intensidade de infecção nos camundongos C57BL/6 foi bem maior do que nos camundongos BALB/c. Enquanto os camundongos da primeira linhagem liberaram uma grande quantidade de oocistos nas fezes, que aumentou marcadamente no quarto dia e continuou a aumentar nos dias consecutivos, os camundongos da linhagem BALB/c desenvolveram uma infecção moderada, com liberação de oocistos 100 vezes menor que os da outra linhagem, evoluindo para cura.

TZIPORI *et al.* (2002), ao estudarem a infectividade de um isolado de *C. parvum* obtido de um bezerro de cervo vermelho (*Cervus elaphus*), observaram que camundongos da linhagem C57BL/6 nocauteados de IFN- γ , após inoculação com 300 oocistos, desenvolveram sintomas de criptosporidiose como letargia, anorexia e reduzido ganho de peso e liberaram grandes quantidades de oocistos nas fezes, apesar de não haverem desenvolvido diarreia.

1.6.2. Participação de outras citocinas na resposta imune a *Cryptosporidium*

Para explicar a acentuada diferença de susceptibilidade à infecção por *C. parvum* de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, nocauteados de

IFN- γ , SMITH *et al.* (2000) avaliaram o padrão de liberação de citocinas de células do baço desses animais, previamente infectados com 2×10^6 oocistos de *C. parvum*, após estimulação "in vitro" com antígenos de esporozoítos. Os esplenócitos dos camundongos BALB/c produziram maior quantidade de interleucinas 12, 4 e 5 (IL-12, IL-4, IL-5) e do fator de necrose tumoral, e os camundongos da linhagem C57BL/6 produziram apenas maior quantidade de IL-5; deste modo, os autores concluíram que na ausência de IFN- γ , a resolução da criptosporidiose é dependente em parte da expressão de citocinas Th2.

Em contraste ao observado nos camundongos nocauteados de IFN- γ , os camundongos da linhagem C57BL/6 atimizados são resistentes à infecção por *C. parvum*, e os camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis (ADJEI *et al.*, 1997). Com o intuito de esclarecer a diferença de susceptibilidade das duas linhagens de camundongos atimizados, ADJEI *et al.* (2000) inocularam camundongos fêmeas, adultas, com 10^6 oocistos de *C. parvum* e analisaram a porcentagem de linfócitos T CD4+, CD8+, $\alpha\beta$ + e $\gamma\delta$ + do baço e do epitélio intestinal. Esses pesquisadores observaram que não houve diferença entre as linhagens, com relação aos linfócitos do baço, no entanto, com relação aos linfócitos intra-epiteliais (IEL), os camundongos da linhagem C57BL/6 tiveram uma maior porcentagem de linfócitos CD4+, CD8+ $\gamma\delta$ e TCR $\gamma\delta$ +. Sendo assim, os autores concluíram que na ausência de resposta imune celular sistêmica, os linfócitos intra-epiteliais CD4+, CD8+ $\gamma\delta$ e TCR $\gamma\delta$ + parecem ter uma importante função regulatória na resposta imune ao *C. parvum*, com produção de citocinas do tipo Th-1 e Th-2.

A importância do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) na resposta imune ao *C. parvum*, foi analisada primeiramente em estudo realizado por CHEN *et al.* (1993b); neste estudo se observou que a administração de uma preparação de anticorpos policlonais anti-TNF- α , antes e durante o experimento de infecção, não induziu maior susceptibilidade ao *C. parvum*. Resultados semelhantes foram observados por MACDONALD & BRANCOFT (1994), contudo administrando um anticorpo monoclonal que neutraliza o TNF- α (Mab TN3-19.12). Esses dados sugerem que o TNF- α não é um importante mediador na resistência inata ao *C. parvum*, apesar de ser uma citocina capaz de induzir a produção de IFN- γ .

A IL-12 é considerada importante no combate à criptosporidiose, principalmente porque tal componente pode induzir a produção de IFN- γ pelas células NK (Natural Killer) e pelos linfócitos T e é um importante mediador de resistência inata dependente de IFN- γ para um grande número de microorganismos, incluindo outros protozoários do Filo Apicomplexa como *Toxoplasma gondii* (HUNTER *et al.*, 1994; KHAN *et al.*, 1994).

Para verificar a ação da IL-12 como modelador da susceptibilidade de camundongos imunocompetentes e imunodeprimidos à infecção por *C. parvum*, URBAN *et al.* (1996) administraram anticorpos policlonais anti IL-12 a camundongos BALB/c recém-nascidos e camundongos C.B17 SCID (camundongos com imunodeficiência severa combinada), antes e após infecção, e observaram que houve aumento significativo da infecção nas mucosas intestinais das duas linhagens estudadas. Com esses resultados, os pesquisadores sugeriram que a IL-12 participa da resistência inata ao *C. parvum* tanto em camundongos imunocompetentes quanto em camundongos imunodeprimidos.

A capacidade protetora da IL-12 foi confirmada em outro experimento realizado no mesmo trabalho, no qual se administrou IL-12 recombinante nas duas linhagens de camundongos estudadas, um dia antes da inoculação com oocistos, demonstrando-se que nenhum dos camundongos das duas linhagens adquiriu criptosporidiose. Os autores concluíram que a cura da criptosporidiose nestes modelos experimentais talvez esteja associada a uma resposta imune do tipo Th2.

No entanto, AGUIRRE *et al.* (1998) demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6, nocauteados de IL-4, desenvolveram infecção prolongada por *C. parvum*, sugerindo que a cura da criptosporidiose está ligada a resposta imune do tipo Th-1; contudo, alguns camundongos eventualmente se curaram da infecção com ou sem a presença de IFN- γ .

Para determinar o efeito da adição ou de uma citocina Th-1 ou de uma citocina Th-2 na infecção por *C. parvum*, SMITH *et al.* (2001) infectaram camundongos C57BL/6 nocauteados de IFN- γ , com oocistos de *C. parvum* e administraram IL-12 ou IL-4 recombinantes por via intraperitoneal e, durante o período da infecção, demonstraram que tais camundongos não se curaram da criptosporidiose estabelecida; pelo contrário, apresentaram uma exacerbação da

doença. Com estes resultados os pesquisadores concluíram que a resistência e recuperação de infecções causadas por *C. parvum* dependem de um balanço refinado na quantidade e sincronização de citocinas Th1 e Th2.

1.7. Modelos experimentais

Para estudo dos aspectos bioquímicos, imunológicos e da biologia celular e molecular de qualquer microorganismo, é essencial que se obtenha um grande estoque do mesmo e no caso do *C. parvum*, alguns fatores precisam ser melhor estudados tais como: o estabelecimento de uma fonte de oocistos de fácil obtenção, a padronização de métodos reprodutíveis de purificação de oocistos e a otimização das condições de crescimento "in vitro" (MORGAN *et al.*, 1995; MELONI & THOMPSON, 1996).

1.7.1. Cultivo "in vitro"

No que diz respeito ao cultivo de *C. parvum* "in vitro", vários pesquisadores (FLANIGAN *et al.*, 1991; GUT *et al.*, 1991; HEALEY *et al.*, 1993; UPTON *et al.*, 1994; UPTON *et al.*, 1995; LAWTON *et al.*, 1997; DENG & CLIVER, 1998) tentaram produzir infecções em monocamadas de células com este parasito, tanto com isolados humanos como de bezerro, observando-se resultados pouco satisfatórios com as várias linhagens celulares, entre elas, MDBK, MDCK, CaCo-2 e HCT-8.

De acordo com WIDMER *et al.* (2000) a falha em perpetuar a infecção "in vitro" é atribuída à apoptose, que em diferentes sistemas de cultura celular, afeta a maioria das células infectadas, sendo um fenômeno responsável por uma drástica redução no número de parasitos intracelulares.

Apesar dessas dificuldades, HIJAWI *et al.* (2001) descreveram o desenvolvimento completo e manutenção em longo prazo de *C. parvum* "in vitro" em cultura de células da linhagem HCT-8. O ciclo completo do parasito foi mantido durante 25 dias, por subcultivo; todavia, apesar dos resultados promissores apresentados, a pouca reprodutibilidade da técnica utilizada e o alto investimento

necessário para manutenção de culturas celulares constituem séria limitação para a implantação desta metodologia na rotina.

1.7.2. Modelos "in vivo"

Para estabelecimento de uma fonte de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, pesquisas têm sido conduzidas inicialmente com algumas espécies de mamíferos como primatas, suínos e camundongos, infectados experimentalmente com oocistos obtidos de bezerros naturalmente infectados, no entanto a maioria das espécies de mamíferos já estudadas adquire resistência natural ao *C. parvum*, nas semanas iniciais de vida (SHERWOOD *et al.*, 1982).

1.7.2.1. Modelo bovino: bezerros recém-nascidos

Para se obter parasitos em massa em condições experimentais, vários pesquisadores infectam bezerros recém-nascidos, utilizando como fonte de inóculo, oocistos isolados de bezerros e cordeiros naturalmente infectados. Os bezerros são infectados imediatamente após o nascimento, preferencialmente antes de terem sido alimentados com colostro. Estes devem ser alojados em completo isolamento a fim de se evitar a exposição a outros patógenos, incluindo *Cryptosporidium* spp de outras fontes, bem como para impedir contaminação do meio (MELONI & THOMPSON, 1996; BAKER *et al.*, 1998).

Vale salientar que esse modelo animal requer recursos de instalação e supervisão por pessoas capacitadas ao atendimento de animais de grande porte e que o risco de infecção para humanos é bastante elevado, em função da grande quantidade de oocistos liberados pelos bezerros infectados. Existem vários relatos de manipuladores de bezerros e estudantes de veterinária que adquiriram criptosporidiose pelo contato com bovinos infectados (BAKER *et al.*, 1998).

1.7.2.2. Modelo primata

O modelo básico que simula muitos dos aspectos da criptosporidiose observada em humanos com AIDS é o do primata com AIDS; enquanto primatas imunocompetentes desenvolvem diarreia aguda auto-limitada, que pode ser duradoura nos primatas jovens, macacos infectados com SIV (Simian Immunodeficiency Virus) desenvolvem criptosporidiose de prognóstico progressivo e fatal, envolvendo os tratos digestivo, biliar e respiratório (RIGGS, 1990; BASKERVILLE *et al.*, 1991).

Apesar de existirem alguns aspectos da criptosporidiose que só podem ser bem estudados em primatas, tais como o delineamento dos vários defeitos imunológicos na mucosa do trato gastrointestinal, associados à progressão da infecção pelo SIV, que contribui para a persistência da infecção e ao dano de mucosa observado na criptosporidiose, esse modelo experimental é de custo elevado, de pouca acessibilidade, e outros fatores, incluindo as considerações éticas, limitam a praticidade de se usá-lo (RIGGS, 1990).

1.7.2.3. Modelo suíno

Porcos recém-nascidos são altamente susceptíveis à criptosporidiose, podendo desenvolver diarreia aquosa, desidratação, má absorção e freqüentemente, morte súbita (TZIPORI *et al.*, 1994). Já suínos adultos raramente desenvolvem diarreia, mas podem excretar oocistos intermitentemente por longos períodos de tempo (SCOTT *et al.*, 1995).

As limitações desse modelo incluem o fato de que a susceptibilidade dos porcos é variável, podendo a criptosporidiose durar curtos períodos de tempo, ter uma longa duração ou resultar em morte súbita e o fato da manutenção desses animais ser tão dispendiosa quanto a de outros animais de grande e médio porte.

1.7.2.4. Modelo murino

Diferentes linhagens de camundongos têm sido utilizadas para realização de experimentos com *C. parvum*, tais como: o estabelecimento de criptosporidiose crônica e obtenção de massa de oocistos (HEINE *et al.*, 1984; UNGAR *et al.*,

1990; RASMUSSEN & HEALEY, 1992; PETRY *et al.*, 1995; MELONI & THOMPSON, 1996; YANG *et al.*, 2000); estudo da susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos à infecção por *C. parvum* (AGUIRRE *et al.*, 1994; MEAD & YOU, 1998); estudo da viabilidade e infectividade de isolados de *C. parvum* (AYDIN & ÖZKUL, 1996; VERGARA-CASTIBLANCO *et al.*, 2000; NEUMANN *et al.*, 2000; DELAUNAY *et al.*, 2000; OKHUYSEN *et al.*, 2002); avaliação de agentes quimioterápicos para combate à criptosporidiose (HEALEY *et al.*, 1995; BLAGBURN *et al.*, 1998) e estudos do mecanismo imune envolvido na susceptibilidade ou não ao *C. parvum* (UNGAR *et al.*, 1986; BLANSHARD *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 1993b; AGUIRRE *et al.*, 1994; MACDONALD & BRANCOFT, 1994; URBAN *et al.*, 1996; THEODOS *et al.*, 1997; AGUIRRE *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 1998; HAYWARD *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2001; LACROIX-LAMANDÉ *et al.*, 2002; LAURENT *et al.*, 2002; TZIPORI *et al.*, 2002).

Quanto à obtenção de oocistos em massa, experimentos utilizando camundongos recém-nascidos das linhagens C57BL/6, ARC/Swiss, BALB/c demonstraram resultados satisfatórios na indução de infecção por *C. parvum* (SHERWOOD *et al.*, 1982; PETRY *et al.*, 1995; MELONI e THOMPSON, 1996), mas dificuldades de manuseio pelo reduzido tamanho dos animais, baixo número de oocistos recuperados e auto-limitação da infecção tornam esse modelo pouco prático para obtenção de oocistos em massa, embora apropriado para estudos de infectividade de cepas de *C. parvum* (NEUMANN *et al.*, 2000; VERGARA-CASTIBLANCO *et al.*, 2000).

HEINE *et al.* (1984) inocularam camundongos da linhagem BALB/c, recém-nascidos e congenitamente atimizados (nude), que são deficientes de células T, com 10^5 oocistos de *C. parvum* e, apesar de não haverem quantificado o número de oocistos recuperados, estabeleceram infecção persistente em todos os camundongos utilizados no experimento; todavia, falharam em induzir infecção em camundongos BALB/c nude adultos (40 dias).

Com o intuito de estabelecer infecções por *C. parvum* em camundongos nude adultos, UNGAR *et al.* (1990) inocularam 14 camundongos da linhagem BALB/c com 30 dias de idade, com 10^7 oocistos e observaram três padrões diferentes de infecção: quatro camundongos morreram no quarto dia após a infecção; três

desenvolveram um declínio gradual e morreram após quatro semanas e três adquiriram criptosporidiose e liberaram oocistos nas fezes durante 16 semanas. Os outros quatro camundongos morreram de causas não relacionadas ao *C. parvum*. No mesmo trabalho os autores administraram anticorpo monoclonal anti-CD4 a um outro grupo de camundongos BALB/c imunocompetentes e recém-nascidos, e, durante o período que durou a imunossupressão, todos os camundongos do grupo liberaram oocistos nas fezes; dessa forma os autores, apesar de não haverem quantificado o número de oocistos recuperados nas fezes dos camundongos, assinalaram a praticidade dos dois modelos estabelecidos para obtenção de oocistos de *C. parvum*, porém, os autores não conseguiram estabelecer infecção por *C. parvum* após administrarem o anticorpo monoclonal anti-CD4 a camundongos BALB/c imunocompetentes adultos.

Vários experimentos foram realizados com camundongos adultos geneticamente imunodeprimidos, como camundongos SCID (camundongos com imundeficiência combinada severa), camundongos congenitamente atimizados ou camundongos nocauteados para determinadas citocinas, contudo, a maioria deles direcionados ao estudo de aspectos referentes à resposta imune e à biologia de *C. parvum*, não sendo direcionados à obtenção de massa de oocistos.

O uso de linhagens susceptíveis de camundongos parece ser promissor, principalmente devido à facilidade de manuseio deste modelo e a possibilidade de se desenvolver um quadro clínico bastante semelhante ao observado na criptosporidiose humana (YANG *et al.*, 2000).

1.7.3. Modelo murino imunossuprimido com glicocorticóides

Já para se obter produção em massa de oocistos, vários pesquisadores empregaram camundongos adultos da linhagem C57BL/6, por serem mais susceptíveis do que camundongos de outras linhagens, submetidos à terapia com o corticosteróide dexametasona, em diferentes dosagens e vias de administração (RASMUSSEN & HEALEY, 1992; PETRY *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2000).

O córtex da supra-renal sintetiza duas classes de hormônios esteróides, a saber, os androgênios e os corticosteróides. Os corticosteróides são divididos, de acordo com seu mecanismo de ação, em glicocorticóides, reguladores do metabolismo de carboidratos, e mineralocorticóides, reguladores do equilíbrio eletrolítico.

Os efeitos farmacológicos dos corticosteróides são amplos, incluindo alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, manutenção do equilíbrio eletrolítico, preservação da função normal do sistema cardiovascular, do sistema imunológico, dos rins, da musculatura esquelética, do sistema endócrino e do sistema nervoso, sendo bem conhecida a ação imunossupressora dos glicocorticóides. Os glicocorticóides podem evitar ou suprimir a inflamação em resposta a vários eventos estimulantes dentre os quais estímulos radiantes, mecânicos, químicos, infecciosos e imunológicos, estando as ações antiinflamatória e imunossupressora indissoluvelmente ligadas, já que ambas resultam, em sua maioria, da inibição de funções específicas dos leucócitos (CHROUSOS, 1995).

Os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides estão relacionados com a indução de linfopenia e diminuição da função linfocitária com perda da capacidade proliferativa das células frente a mitógenos específicos (PINTO, 1991). Além disso, os glicocorticóides apresentam efeitos sobre a resposta imunológica específica do hospedeiro, pelos efeitos sobre a produção de citocinas dentre as quais o IFN- γ , fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos, interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6) e TNF- α (GOODMAN & GILMAN, 1996).

A indução de linfopenia foi inicialmente observada por FAUCI & DALE (1974) ao administrarem o glicocorticóide hidrocortisona a humanos normais por via intravenosa, verificando que os valores absolutos de linfócitos e monócitos da circulação sanguínea diminuem após um período de 4 a 6 horas da administração da droga, retornando ao normal após 24 horas, ocasionando uma depleção seletiva no número de linfócitos.

FAUCI (1975) ainda investigou o efeito do glicocorticóide acetato de cortisona quando administrado em cobaias, demonstrando que esta droga causa profunda, mas transitória linfopenia, que atingia um pico após 4 horas, retornando a

contagens normais em 24 horas. Verificou ainda que havia uma diminuição proporcional do número de linfócitos T totais, quando comparados aos linfócitos T circulantes e que a linfopenia sanguínea era resultante da redistribuição dos linfócitos circulantes para a medula óssea.

Com relação ao uso de glicocorticóide como droga imunossupressora, para posterior indução de criptosporidiose em modelo murino, RASMUSSEN & HEALEY (1992) determinaram a susceptibilidade de camundongos fêmeas, adultos, de cinco diferentes linhagens (C57BL/6, C3H/HeN, BALB/nAnN, DBA/2N e CBA) imunossuprimidos com o glicocorticóide dexametasona, empregando vários regimes de administração da droga. Um grupo de camundongos adultos (10 por linhagem) recebeu dexametasona na água potável, numa concentração equivalente a 5µg/dia, que, segundo REHG *et al.* (1988), seria efetiva para indução de imunossupressão em ratos; contudo os autores não observaram liberação de grandes quantidades de oocistos neste grupo. Um segundo grupo de camundongos adultos (20 por linhagem) foi dividido em quatro subgrupos e cada um dos subgrupos recebeu dexametasona por via intraperitонеal nas doses de 62,5; 125; 250 ou 500µg/dia. A droga foi administrada durante 83 dias, e, neste período, observou-se que apenas os camundongos da linhagem C57BL/6, quando imunossuprimidos com 125µg/dia por via intraperitонеal, demonstraram-se susceptíveis a infecção por *Cryptosporidium parvum*, já que liberaram uma grande quantidade de oocistos nas fezes, até o final do período no qual foi realizado o experimento. Os animais de todas as cinco linhagens estudadas, quando foram imunossuprimidos com doses superiores a 125µg/dia chegaram a óbito.

Neste mesmo sentido, PETRY *et al.* (1995) induziram imunossupressão em camundongos adultos, fêmeas da linhagem C57BL/6, injetando dexametasona durante quatro dias alternados, por via subcutânea, nas doses de 250, 500 ou 1000µg por animal. Após infecção com 10⁵ oocistos de *C. parvum* por animal, os autores constataram que os camundongos imunossuprimidos com 1000µg de dexametasona liberaram maior quantidade de oocistos quando comparado aos outros grupos.

YANG et al. (2000) demonstraram que camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 16µg/ml de dexametasona, administrados na água potável, e infectados com apenas um oocisto, desenvolveram infecção patente, porém sem liberação de oocistos nas fezes; a infecção só foi constatada em cortes histológicos de íleo terminal (2cm distais) corados com hematoxilina e eosina. Ao se examinarem as lâminas, verificou-se *C. parvum* produzindo atrofia e fusão das vilosidades e dilatação das criptas intestinais. Apesar disso, em trabalho anterior, YANG & HEALEY (1993) demonstraram que a administração de dexametasona na água potável a camundongos C57BL/6 induziu uma maior mortalidade, com sinais de toxicidade mais evidentes, em relação à administração por via intraperitoneal.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Dificuldades na realização de estudos que requerem oocistos de *Cryptosporidium parvum* em massa justificam a necessidade de se desenvolver modelo experimental adequado para manutenção do parasito, já que a maioria dos modelos animais não é susceptível à infecção por este protozoário.

Existem estratégias descritas na literatura para a obtenção de oocistos de *C. parvum* a partir da infecção de bezerros neonatos, todavia, o estabelecimento de um esquema para indução de imunossupressão com corticosteróide, em camundongos adultos, em nível adequado para se estabelecer um modelo experimental de infecção, parece ser uma alternativa de grande interesse para aprofundar aspectos referentes à biologia deste parasito, e, principalmente, obter massa de oocistos a serem empregados em futuros estudos bioquímicos, moleculares e imunológicos e como fonte de antígenos na produção de imunoreagentes.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Geral

Estabelecer modelo animal para obtenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* infectando camundongos adultos das linhagens BALB/c e C57BL/6, imunossuprimidos com glicocorticóide.

Específicos

Verificar as condições adequadas para a indução de imunossupressão em camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, com emprego do glicocorticóide dexametasona, comparando a contagem global e diferencial de leucócitos no sangue periférico;

Acompanhar a infecção em camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, imunossuprimidos com dexametasona e submetidos à inoculação intragástrica com oocistos obtidos de bezerro experimentalmente infectado com *C. parvum*;

Avaliar a viabilidade do modelo experimental murino para obtenção de oocistos em massa, quantificando os oocistos liberados nas fezes dos camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c infectados com *C. parvum*, para análise de rendimento.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Imunossupressão de camundongos

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre 2 e 3 meses e peso variando de 20 a 25 gramas e machos da linhagem C57BL/6, com a mesma idade e o mesmo peso, foram obtidos nos biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, respectivamente.

Os camundongos da linhagem BALB/c foram escolhidos por pertencerem a uma linhagem de maior acessibilidade, com grande disponibilidade nos biotérios; além disso, para estabelecer e verificar as condições do efeito imunossupressor do corticóide dexametasona. A escolha dos camundongos da linhagem C57BL/6 baseou-se em dados da literatura indicando grande susceptibilidade desses ao desenvolvimento de criptosporidiose após imunossupressão com dexametasona e infecção com oocistos de *C. parvum*. Embora a maioria das pesquisas costume utilizar camundongos fêmeas, frente às dificuldades encontradas para adquirir camundongos C57BL/6 fêmeas, optou-se pelo uso de camundongos machos dessa linhagem.

Como droga imunossupressora utilizou-se dexametasona injetável adquirida em frasco ampola de 2,5ml, na concentração de 4mg/ ml, com o nome comercial Decadron (Merck). A via de administração utilizada foi a subcutânea, devido à facilidade de padronização da dosagem de imunossupressor administrada para cada camundongo e a menor toxicidade.

O corticosteróide foi administrado diariamente, nas dosagens de 0,5mg e 1mg, por um período de 21 dias, nos camundongos BALB/c e na dose de 0,5 mg, por um período de 14 dias, nos camundongos C57BL/6.

Os camundongos utilizados na fase de padronização do esquema de imunossupressão (experimento 1) foram separados em grupos, da seguinte maneira:

- grupo A: 20 camundongos BALB/c fêmeas, imunossuprimidos com 1mg de dexametasona por animal, diariamente;

- grupo B: 10 camundongos BALB/c fêmeas, imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona por animal, diariamente;
- grupo C: 10 camundongos C57BL/6 machos, imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona por animal, diariamente.

As dosagens de 0,5mg e 1mg de dexametasona foram escolhidas após uma análise cuidadosa das dosagens utilizadas por outros pesquisadores, que variaram a dose de imunossupressão de 0,175mg até 1mg por animal, e apesar das variações no esquema de imunossupressão e nos resultados de cada um deles, preferimos realizar os experimentos utilizando estas duas doses.

Vale salientar que, tendo em vista a dificuldade de obtenção de camundongos da linhagem C57BL/6, a imunossupressão desses camundongos foi realizada apenas na dosagem de 0,5mg de dexametasona, para não correr o risco de perder animais utilizando uma dose sabidamente elevada de corticóide.

4.1.1. Avaliação da imunossupressão

Para analisar a imunossupressão, foi realizado leucograma, que permite a contagem do número relativo e absoluto de leucócitos. Tal técnica foi realizada a cada seis dias, até se observar uma considerada diminuição do número absoluto de leucócitos (50% em média) e inversão do número relativo de linfócitos no sangue periférico (contagem de linfócitos em torno de 25%, em um total de 100 células).

A quantidade de leucócitos totais por mm^3 de sangue foi estimada por intermédio da contagem do número absoluto, e através da contagem diferencial pode-se acompanhar o comportamento dos linfócitos após administração da droga imunossupressora. O leucograma foi realizado somente até o dia da infecção, para evitar que um somatório de procedimentos viesse a provocar o óbito dos animais.

Amostras de 25 μl de sangue dos animais submetidos à imunossupressão foram diluídas na proporção 1:20 em líquido de Türk e contadas em câmara de Neubauer, sendo a leitura da contagem diferencial realizada em microscópio

óptico, através de esfregaço sangüíneo, corado pelo Leishman (Merck S. A.; Indústria Química, R. J.).

4.1.2. Manutenção de camundongos imunossuprimidos

Os animais imunossuprimidos foram mantidos em condições rigorosas de qualidade sanitária, sendo todo o material utilizado autoclavado e esterilizado (gaiolas, bebedouros, maravalha), com o intuito de evitar a infecção dos camundongos com outros patógenos. Para manutenção diária dos camundongos, os equipamentos de proteção individual incluíram avental descartável, máscara, luvas e óculos de proteção.

4.2. Obtenção de *Cryptosporidium parvum* a partir de bezerro

Para obtenção de oocistos de *C. parvum*, um bezerro da raça holandesa recebido por doação de uma fazenda do Município de Caçapava, Vale do Paraíba, SP, com cinco dias de idade, sem ter mamado colostro da sua progenitora, foi infectado por via oral com $2,5 \times 10^7$ oocistos. Estes foram obtidos a partir de um outro bezerro naturalmente infectado, proveniente da mesma fazenda que o primeiro. O animal permaneceu no biotério do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Taubaté (UNITAU), recebendo os devidos cuidados até cessar a liberação dos oocistos. Para diminuir a quantidade de gordura presente nas fezes, durante todo o período da infecção o bezerro foi alimentado diariamente com dois litros de leite desnatado. Após ter cessado a diarreia e com o término da liberação dos oocistos, o animal passou a receber diariamente dois litros de leite integral e água.

Com o início do processo diarréico, as fezes passaram a ser armazenadas em saco coletor sem conservantes, sendo diariamente transferidas para recipientes contendo solução de dicromato de potássio a 5%, na proporção 1:2. Para verificação da presença ou ausência de oocistos de *C. parvum* nas fezes, as amostras foram analisadas pela técnica de flutuação em solução de sacarose

(SHEATER, 1923). Este procedimento foi realizado até constatação da ausência de oocistos nas fezes do animal.

4.2.1. Purificação de oocistos e preparação do inóculo para infecção dos camundongos

Os oocistos excretados nas fezes dos bezerros foram isolados pela técnica de purificação em gradiente de sacarose (BUKHARI & SMITH, 1995). Cerca de 2ml de fezes preservadas em dicromato de potássio a 5% foram homogeneizados em tubos de fundo cônico de 15ml contendo 10ml de solução de Sheater (sacarose: densidade 1,20g/ml); a suspensão obtida foi centrifugada à 1500rpm por 10 minutos. Após centrifugação foram removidos cerca de 2ml da camada superior, contendo os oocistos, e colocados em outro tubo cônico contendo 13ml de água destilada, sendo que a suspensão obtida foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos, para remoção da sacarose. Este procedimento foi repetido até completa remoção da sacarose. Ao precipitado obtido foi adicionado hipoclorito de sódio, para remoção de contaminantes e a suspensão resultante foi novamente centrifugada a 3000rpm por 10 minutos e posteriormente lavada três vezes com água bidestilada para remoção do hipoclorito. Os oocistos presentes foram ressuspensos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), 0,01M, pH 7,2 para um volume final de 1,5ml.

Para a preparação do inóculo utilizado na infecção dos camundongos, procedeu-se a quantificação dos oocistos obtidos no procedimento de purificação, confeccionando-se esfregaços com 10 μ l da solução de PBS contendo os oocistos. Os esfregaços foram corados pela técnica de Kinyoun modificada (metodologia descrita no Anexo 1) e o número de oocistos quantificado foi convertido para o volume final de 1,5ml. Posteriormente realizou-se diluição dessa suspensão de oocistos, preparando-se os inóculos empregados nas infecções.

4.3. Infecção de camundongos e coleta dos oocistos

Uma vez estabelecido o esquema de imunossupressão, novos grupos de camundongos das duas linhagens estudadas foram imunossuprimidos com dexametasona e infectados por inoculação intragástrica com solução de PBS contendo 2×10^4 oocistos purificados, em dose única, diluídos em 0,1ml de PBS 0,01M (pH 7,2). A infecção foi realizada no 14^o dia do procedimento de imunossupressão sendo que a administração diária de dexametasona foi mantida até o final do experimento.

Os camundongos infectados foram divididos em grupos da seguinte maneira:

- grupo 1: 10 camundongos BALB/c fêmeas imunossuprimidos com 1mg de dexametasona por animal, diariamente, e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum*;
- grupo 2: 10 camundongos BALB/c fêmeas imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona por animal, diariamente, e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum*;
- grupo 3: 10 camundongos C57BL/6 machos, imunossuprimidos com 0,5mg por animal, diariamente, e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum*.

Com o intuito de acompanhar a infecção, para cada grupo de camundongo imunossuprimido e infectado (grupos 1, 2 e 3) foram utilizados grupos controle distribuídos da seguinte maneira:

- grupo 4: 5 camundongos BALB/c não imunossuprimidos e não infectados – para analisar as condições sanitárias do ambiente;
- grupo 5: 5 camundongos C57BL/6 não imunossuprimidos e não infectados – com a mesma função do grupo 4;
- grupo 6: 5 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 1 mg de dexametasona diariamente e não infectados – para analisar se o procedimento de imunossupressão, isoladamente, não seria fatal aos camundongos;
- grupo 7: 5 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 0,5 mg de dexametasona diariamente e não infectados – com a mesma função do grupo 6;
- grupo 8: 5 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 0,5 mg de dexametasona diariamente e não infectados – com a mesma função do grupo 6;

- grupo 9: 5 camundongos BALB/c não imunossuprimidos e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* – para avaliar se o inóculo utilizado, sem a presença da droga imunossupressora, seria suficiente para induzir uma infecção na linhagem de camundongo estudada.
- grupo 10: 5 camundongos C57BL/6 não imunossuprimidos e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* – com a mesma função do grupo 9.

4.3.1. Acompanhamento da infecção dos camundongos

Para acompanhamento da infecção, os camundongos foram isolados individualmente em gaiolas esterilizadas e pavimentadas com arame. As fezes liberadas diariamente ficaram sobre toalhas de papel dispostas na parte inferior das gaiolas, toalhas estas que foram umedecidas com água destilada e trocadas diariamente (Anexo 2). O volume total de fezes eliminadas diariamente por cada camundongo foi armazenado em tubos contendo dicromato de potássio a 5%, na proporção de 1:3, obtendo-se suspensões fecais que foram examinadas para verificação da presença de oocistos de *C. parvum*. Em um tubo cônico com capacidade para 15ml, 3ml da suspensão de fezes obtida foram dissolvidos em 10ml de solução de sacarose, densidade $1,2\text{g/cm}^3$, sendo esta suspensão homogeneizada e centrifugada a 1500rpm por 10 minutos. Com o auxílio de uma alça de platina, duas amostras da película superficial do centrifugado foram transferidas para uma lâmina de microscopia e recobertas separadamente com lamínulas de vidro de 1cm^2 . A pesquisa de oocistos de *C. parvum* foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 400X.

4.3.2. Recuperação de oocistos das fezes dos camundongos infectados

Para se recuperar os oocistos liberados nas fezes dos camundongos infectados, alíquotas de 3ml da suspensão fecal obtida foram processadas em tubo cônico, contendo 10ml de solução de sacarose, sendo que após centrifugação a 1500rpm por 10 minutos, os 2ml da camada superior da solução

foram recuperados com o auxílio de pipeta automática e transferidos para outro tubo cônico com capacidade para 15ml, contendo 13ml de água destilada. A suspensão obtida foi submetida à centrifugação a 3000rpm, por 10 minutos, para remoção da sacarose, permitindo assim que os oocistos precipitassem. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Finalmente o sedimento foi desinfectado com hipoclorito de sódio e lavado por três vezes com água destilada realizando-se centrifugação a 3000rpm por 10 minutos e ressuspensão em 1,5ml de PBS, para posterior quantificação.

4.3.3. Quantificação dos oocistos de *C. parvum* recuperados das fezes dos camundongos infectados

Para quantificação dos oocistos recuperados das fezes dos camundongos, foram confeccionados esfregaços de 10 μ l, partindo da solução estocada em PBS, sendo estes posteriormente corados pela técnica de Kinyoun modificada. O número de oocistos foi contado e convertido para o volume final da suspensão de fezes purificadas de cada camundongo, e, posteriormente, para o total de fezes eliminada diariamente por cada animal.

4.3.4. Manutenção da cepa de *C. parvum* isolada

Após isolamento da cepa de *C. parvum*, realizou-se inoculação de um novo grupo de camundongos da linhagem C57BL/6, imunossuprimidos diariamente com 0,5mg de dexametasona por via subcutânea, com o intuito de verificar a infectividade dos oocistos recuperados dos camundongos infectados inicialmente, bem como para verificar a viabilidade do modelo experimental utilizando camundongos imunossuprimidos com dexametasona.

Neste segundo experimento, cinco camundongos (grupo 11) da linhagem C57BL/6, imunossuprimidos com dexametasona, foram infectados com os oocistos recuperados do primeiro experimento de imunossupressão e infecção. O inóculo deste grupo de camundongos foi o mesmo utilizado anteriormente, 2×10^4

oocistos por animal. Neste grupo, as fezes liberadas diariamente por todos os camundongos foram coletadas e armazenadas em um mesmo tubo coletor.

Os oocistos recuperados foram purificados por flutuação em solução de sacarose, e a suspensão obtida foi submetida à desinfecção com hipoclorito de sódio e armazenada em dicromato de potássio para manter a viabilidade dos oocistos; a quantificação dos oocistos recuperados foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.

4.4. Análise estatística

Os valores medianos dos leucócitos foram comparados empregando-se o teste Kruskal-Wallis complementado *a posteriori* pelo método de Student-Newman-Keuls, que permite a comparação múltipla, para isolar o grupo ou grupos que diferem estatisticamente dos outros, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da imunossupressão dos camundongos

Todos os camundongos, de ambas as linhagens, que foram imunossuprimidos apresentaram uma sintomatologia clínica semelhante, tendo como sintomas mais marcantes perda de peso, inapetência e prostração. No decorrer do procedimento de imunossupressão alguns camundongos também desenvolveram escaras na pele, na região próxima a cauda, talvez devido à lesão causada pelas repetidas aplicações do corticóide no local.

Não houve óbito de camundongos da linhagem BALB/c durante o procedimento de imunossupressão, no entanto os camundongos da linhagem C57BL/6 imunossuprimidos começaram a morrer após a segunda semana de corticoterapia, razão pela qual realizamos o leucograma dessa linhagem apenas nas duas primeiras semanas do experimento.

Nas Tabelas 1, 2 e 3, estão apresentados os resultados de leucograma expressos em valores absolutos de leucócitos (n° de leucócitos/ mm^3 de sangue) e valores relativos (porcentagem) de neutrófilos segmentados e linfócitos do sangue periférico, dos camundongos do grupo A, B e C, respectivamente, durante a administração de dexametasona. Os valores medianos dos leucócitos dos grupos A, B e C, durante o procedimento de imunossupressão, estão representados na figura 1.

Figura 1. Número de leucócitos/mm³ de sangue de camundongos, expressos em medianas: Grupo A - 20 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 1,0mg de dexametasona; Grupo B - 10 camundongos BALB/c imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona e grupo C - 10 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona

Após comparação dos valores medianos dos leucócitos, pelo teste Kruskal-Wallis complementado pelo método de Student-Newman-Keuls, verificou-se que quando os camundongos da linhagem BALB/c foram imunossuprimidos com 1mg de dexametasona, os valores de leucócitos totais do sangue periférico, antes do procedimento de imunossupressão, diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos valores observados após a primeira e segunda semana de imunossupressão, que não diferenciaram significativamente entre si ($p > 0,05$); entretanto na terceira semana de imunossupressão o número de leucócitos foi estatisticamente semelhante ao observado antes do procedimento de imunossupressão, ou seja, igual aos valores normais (Tabela 1 - grupo A).

Já os camundongos da linhagem BALB/c que foram imunossuprimidos com 0,5mg diárias de dexametasona, apresentaram os valores de leucócitos totais do sangue periférico, antes do procedimento de imunossupressão, significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores observados após a primeira, segunda e terceira semana de imunossupressão, que por sua vez não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), indicando que após a primeira semana da administração de

dexametasona, a droga induziu uma imunossupressão que se manteve em um mesmo patamar até a terceira semana de imunossupressão (Tabela 2 – grupo B).

No caso dos camundongos da linhagem C57BL/6, imunossuprimidos com 0,5mg de dexametasona, observou-se que os valores de leucócitos totais do sangue periférico, antes do procedimento de imunossupressão, diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos valores observados após a primeira e segunda semana de imunossupressão, que não diferiram significativamente entre si (Tabela 3 – grupo C).

Com relação aos valores relativos de leucócitos, observou-se que tanto na linhagem BALB/c quanto na C57BL/6, em ambos os protocolos de imunossupressão, houve uma inversão na proporção dos valores de linfócitos em relação aos neutrófilos no decorrer da administração da droga (Tabelas 1, 2, 3).

Tabela 1. Resultados do leucograma de sangue periférico de 20 camundongos BALB/c fêmeas (grupo A) submetidas à imunossupressão com dose diária de 1mg de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira, segunda e terceira semana da imunossupressão

Camundongos	Neutrófilos (VR)				Linfócitos (VR)			
	A.I.	1ªsem.	2ªsem.	3ªsem.	A.I.	1ªsem.	2ªsem.	3ªsem.
1	30	84	84	78	70	16	16	22
2	25	88	95	91	75	12	5	9
3	21	87	90	72	79	13	10	28
4	24	88	94	79	76	14	6	21
5	26	90	90	90	74	10	10	10
6	25	89	90	85	75	11	10	15
7	30	82	95	72	70	18	5	28
8	30	89	92	81	70	11	8	19
9	27	88	90	88	73	12	10	12
10	28	94	90	86	72	8	10	14
11	21	-	-	-	69	-	-	-
12	30	80	90	-	70	20	10	-
13	29	88	95	90	71	14	5	10
14	28	95	-	-	72	5	-	-
15	30	93	86	-	70	7	4	-
16	32	89	90	-	68	11	10	-
17	32	90	95	92	68	10	5	8
18	31	92	96	-	69	8	4	-
19	30	90	90	-	70	10	10	-
20	23	89	94	94	77	11	6	8

VA = Valores Absolutos (nº de células/mm³ de sangue); VR = Valores Relativos (%); (-) = Dado não obtido

Tabela 2. Resultados do leucograma de sangue periférico de 10 camundongos BALB/c fêmeas (grupo B) submetidas à imunossupressão com dose diária de 0,5mg de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira, segunda e terceira semana da imunossupressão

Camundongos	Neutrófilos (VR)				Linfócitos (VR)			
	A.I.	1ªsem.	2ªsem.	3ªsem.	A.I.	1ªsem.	2ªsem.	3ªsem.
1	17	50	73	68	89	46	27	32
2	24	47	-	56	54	46	-	43
3	23	48	-	52	72	47	-	48
4	11	48	70	86	88	47	30	34
5	25	50	-	74	75	48	-	28
6	20	40	65	60	78	59	35	40
7	28	67	48	68	88	32	52	32
8	21	47	64	-	70	56	36	-
9	4	34	-	64	91	66	-	36
10	18	32	70	58	71	62	28	42

VA= Valores Absolutos (nº de células/mm³ de sangue); VR= Valores Relativos (%); (-) = Dado não obtido

Tabela 3. Resultados do leucograma de sangue periférico de 10 camundongos C57BL/6 machos (grupo C) submetidos à imunossupressão com dose diária de 0,5mg de dexametasona, antes (A.I.) e após a primeira e segunda semana da imunossupressão

Camundongos	Neutrófilos (VR)			Linfócitos (VR)		
	A.I.	1ªsem.	2ªsem.	A.I.	1ªsem	2ªsem.
1	13	65	80	87	35	19
2	13	65	75	87	35	35
3	10	70	75	90	30	35
4	10	84	90	90	18	10
5	11	74	85	89	26	14
6	9	84	89	90	16	10
7	8	60	70	94	40	28
8	6	60	65	91	40	35
9	12	60	80	88	40	20
10	10	65	85	80	45	15

VA = Valores Absolutos (nº de células/mm³ de sangue); VR = Valores Relativos (%); (-) = Dado não obtido

5.2. Quantificação dos oocistos recuperados de camundongos infectados

Apenas os camundongos da linhagem C57BL/6 que foram imunossuprimidos e infectados com *C. parvum* (grupo 3) desenvolveram infecção e liberaram grandes quantidades de oocistos nas fezes, o mesmo não ocorrendo com os camundongos dos grupos controle da mesma linhagem (grupos 5, 8 e 10), nem com os camundongos da linhagem BALB/c (grupos 1 e 2) e seus respectivos grupos controle (grupos 4,6,7 e 9).

Os números de oocistos, expressos em média aritmética, recuperados dos camundongos do grupo 3 estão representados na figura 2. Nota-se que a maior liberação de oocistos se deu no oitavo dia após a infecção. Os valores a partir do 18º dia do experimento não estão apresentados, já que a partir deste dia apenas três camundongos estavam vivos.

Figura 2. Número total de oocistos, expressos em média aritmética, recuperados a partir das fezes de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5mg de dexametasona (grupo 3), até o 17º dia pós-infecção

Na tabela 4 está apresentado o número total de oocistos recuperados por camundongos da linhagem C57BL/6 imunossuprimidos e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* (grupo 3). Todos os camundongos do grupo 3 liberaram oocistos nas fezes, a partir do quinto dia da infecção, sendo esse diagnóstico realizado pela técnica de flutuação em sacarose (SHEATER, 1923). Todavia, observaram-se variações no tempo de sobrevivência dos camundongos, sendo que apenas um deles permaneceu vivo e liberando oocistos até o final do período de infecção (29º dia).

No quadro 1 estão representados os números de camundongos que evoluíram ao óbito, de todos os grupos que foram utilizados em nossos experimentos, demonstrando que só os camundongos da linhagem C57BL/6 que foram imunossuprimidos ou imunossuprimidos e infectados com *C. parvum* morreram.

Quadro 1. Resumo dos procedimentos de imunossupressão e infecção realizados e do dia de óbito dos animais

Grupos	linhagens	dexametasona	inóculo	n*	nº de óbitos	dia do óbito
A	BALB/c	1 mg diário	-	20	zero	-
B	BALB/c	0,5 mg diário	-	10	zero	-
C	C57BL/6	0,5 mg diário	-	10	03	15º dia
1	BALB/c	1 mg diário	2×10^4 oocistos	10	zero	-
2	BALB/c	0,5 mg diário	2×10^4 oocistos	10	zero	-
3	C57BL/6	0,5 mg diário	2×10^4 oocistos	10	06	14º dia
4	BALB/c	-	-	05	zero	-
5	C57BL/6	-	-	05	zero	-
6	BALB/c	1 mg diário	-	05	zero	-
7	BALB/c	0,5 mg diário	-	05	zero	-
8	C57BL/6	0,5 mg diário	-	05	01	15º dia
9	BALB/c	-	2×10^4 oocistos	05	zero	-
10	C57BL/6	-	2×10^4 oocistos	05	zero	-
11	C57BL/6	0,5 mg diário	2×10^4 oocistos	05	05	12º dia

*n - nº de animais por grupo

Tabela 4. Número de oocistos de *C. parvum* recuperados das fezes de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5mg de dexametasona (grupo 3), do 1º ao 15º dia pós-infecção

Camundongo	Período de infecção em dias														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0	0	0	0	3875	11603	1050	105000	23100	+	+	6825	+	16338	+
2	0	0	0	0	5363	8400	26775	40800	23625	+	+	+	Óbito		
3	0	0	0	0	1260	+	2635	28875	11340	22050	6400	8863	4620	315	1260
4	0	0	0	0	3938	1680	3780	Óbito							
5	0	0	0	0	+	11025	16800	16800	1050	+	210	+	Óbito		
6	0	0	0	0	2205	240	+	+	Óbito						
7	0	0	0	0	8505	49875	19320	17220	10500	102900	58700	13650	81375	58800	52500
8	0	0	0	0	56595	28823	73080	24570	23100	33075	37800	5145	24570	4725	4043
9	0	0	0	0	+	6075	58275	Óbito							
10	0	0	0	0	+	+	788	9823	28980	54180	9555	1470	12075	Óbito	
Total/dia	0	0	0	0	81541	117721	202703	243188	121895	192380	112685	35753	122640	80378	57803

Tabela 4(cont.)

Camundongo	Período de infecção em dias														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	7920	13650	3675	15583	15120	12758	3675	Óbito							Total/ camundongo
2															240182
3	27720	1280	135240	37800	88750	28350	Óbito								104963
4															368893
5															9388
6															45885
7	51880	7140	44100	28350	6825	2835	91875	4095	80850	65100	12600	42525	38225	18900	2445
8															Óbito
9	+	+	12285	+	+	8453	Óbito								984425
10															336284
Total/dia	87300	22050	195300	81743	88695	52398	91875	4095	80850	65100	12600	42525	38225	18900	64350
															116971
															2251776

+ = devido ao baixo parasitismo não foi possível quantificar

Alguns camundongos liberaram pequenas quantidades de oocistos em determinados dias, não sendo possível recupera-los, devido à perda destes no procedimento de purificação. Na figura 3 está representado o total de oocistos obtidos na infecção experimental do grupo 3, verificando-se um rendimento cerca de 10 vezes maior que o inóculo utilizado.

Figura 3. Número total de oocistos inoculados e número total de oocistos recuperados do grupo 3 (10 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5mg de dexametasona e inoculados com 2×10^4 oocistos de *Cryptosporidium parvum*)

5.3. Manutenção da cepa de *Cryptosporidium parvum* em camundongo

O grupo de cinco camundongos da linhagem C57BL/6 (grupo 11) infectado com oocistos isolados do grupo 3 também iniciou a liberação de oocistos nas fezes a partir do 4º dia de infecção. Dentre os cinco animais, três morreram no 10º dia da infecção e os outros dois morreram no 12º dia. Na figura 4 está representado o total de oocistos recuperados nesse grupo de camundongos, durante os doze dias nos quais os animais eliminaram oocistos.

Figura 4. Número total de oocistos inoculados e número total de oocistos recuperados do grupo 11 (5 camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5mg de dexametasona e inoculados com 2×10^4 oocistos de *Cryptosporidium parvum* recuperados dos camundongos do grupo 3)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A manutenção do ciclo de *Cryptosporidium parvum* em laboratório é de importância fundamental para a obtenção de parasitos em massa e para produção de antígenos à serem empregados em estudos imunológicos, moleculares e para esclarecimento dos vários aspectos que dizem respeito à relação parasito-hospedeiro.

No início de nosso trabalho, convivemos com a dificuldade de se obter uma fonte de *C. parvum* para concretização de estudos que já vinham sendo realizados no nosso laboratório; para isto, foi necessário efetuar um trabalho de busca exaustiva de bezerros que estivessem liberando oocistos nas fezes, em algumas fazendas de gado leiteiro do município de Caçapava.

Apesar da grande quantidade de oocistos recuperáveis de fezes de bezerros infectados, as dificuldades de manutenção desse modelo, tais como os riscos de contaminação do meio e a necessidade de um espaço adequado para permanência do animal, nos levaram a avaliar o modelo murino para manutenção deste protozoário.

Em nossos experimentos para infecção do bezerro, foi necessária uma adaptação cuidadosa das condições laboratoriais: o animal foi isolado em local adequado e foi alimentado com leite desnatado para evitar a presença de gordura nas fezes, o que dificultaria a flutuação dos oocistos na solução de sacarose. Vale salientar que, apesar do bezerro ter sido alimentado com leite desnatado, a matéria fecal coletada se manteve com uma considerável quantidade de gordura e detritos, o que de certo modo dificultou a recuperação e quantificação dos oocistos de *C. parvum*.

Sendo o bezerro um animal pouco usual em nossos trabalhos laboratoriais, houve maior dificuldade em sua manutenção, tendo sido necessária, devido ao seu porte, presença de dois manipuladores para alimentá-lo e coletar a matéria

fecal; além disso, em função do elevado volume de fezes excretadas pelo animal, existiu um risco potencial de contaminação do meio e dos manipuladores.

Por outro lado, quando trabalhamos com camundongos, um único manipulador manuseou os animais e devido à pequena quantidade de gordura na matéria fecal, apenas uma etapa de purificação em solução de sacarose foi suficiente para se obter uma preparação contendo oocistos purificados, com pequena quantidade de detritos. Ademais, devido ao fato dos camundongos se encontrarem numa área restrita, em gaiolas individualizadas, foram menores os riscos de contaminação pessoal e ambiental quando comparado com o observado na manipulação do bezerro.

No presente estudo, demonstramos que a administração de dexametasona por via subcutânea, na dose diária de 0,5mg, a camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 durante todo o período do experimento de imunossupressão, alterou o quadro imunológico dos animais, induzindo à diminuição da contagem global de leucócitos circulantes, bem como à diminuição significativa dos valores relativos dos linfócitos na circulação sanguínea, a partir do 6º dia de administração do corticosteróide. Segundo PINTO (1991), este quadro de leucopenia e linfopenia, acompanhado de neutrofilia, pode ser usado como critério seguro na avaliação imunológica do modelo experimental murino submetido à corticoterapia.

No decorrer do esquema de imunossupressão dos camundongos BALB/c, ao administrarmos a dose de 1mg de dexametasona diárias por camundongo, os valores globais de leucócitos retornaram a níveis normais na 3ª semana do procedimento de imunossupressão (tabela 1), indicando que pode ter havido algum fator que levou a não manutenção da atividade imunossupressora da droga.

Já o esquema de administração de 0,5mg de dexametasona por animal permitiu o desenvolvimento de um quadro de imunossupressão eficiente nas duas linhagens de camundongo estudadas. Apesar disso, só os camundongos da linhagem C57BL/6 desenvolveram criptosporidiose, eliminando oocistos nas fezes,

indicando que existe um fator de predisposição genético fundamental na susceptibilidade ou não à infecção pelo *C. parvum*.

Este fato foi inicialmente demonstrado por RASMUSSEN & HEALEY (1992), que, ao analisarem a susceptibilidade de cinco diferentes linhagens de camundongos à imunossupressão, seguida de infecção com oocistos de *C. parvum*, evidenciaram que os camundongos da linhagem C57BL/6 são promissores para o desenvolvimento de infecções crônicas e para avaliação do potencial de agentes anti- *Cryptosporidium parvum*, ao contrário das outras linhagens estudadas.

Dentre as três vias de administração utilizadas em outros trabalhos, intraperitoneal, subcutânea e oral, escolhemos a via subcutânea para realização do experimento de imunossupressão, devido à facilidade de padronização da dose de imunossupressor administrada para cada camundongo e menor toxicidade.

Segundo GOODMAN & GILMANN (1996) a velocidade de absorção de uma droga após injeção subcutânea é suficientemente estável e lenta para proporcionar um efeito constante, o que prolonga o efeito da droga e diminui a toxicidade, quando comparada às vias oral e intraperitoneal, que por propiciarem uma maior velocidade de absorção da droga, podem aumentar a toxicidade desta.

A inoculação de 2×10^4 oocistos de *C. parvum*, pela via intragástrica, apesar de ser significativamente menor que a quantidade utilizada por outros pesquisadores (RASMUSSEN & HEALEY, 1992; PETRY *et al.*, 1995), foi suficiente para induzir infecção com liberação de consideráveis quantidades de oocistos nas fezes dos camundongos, podendo ser uma ferramenta interessante para amplificação de pequenos isolados, obtidos de bezerros que venham a eliminar pequenas quantidades desse parasito nas fezes.

O óbito de alguns camundongos da linhagem C57BL/6, no início do período de infecção, pode ter ocorrido em função de um somatório do efeito

imunossupressor da droga com o efeito da própria infecção; da mesma maneira o óbito de camundongos da linhagem C57BL/6 que foram apenas imunossuprimidos (grupo C e grupo 8) indica uma maior susceptibilidade desses camundongos à imunossupressão com esse corticóide, assinalando a necessidade de uma melhor padronização da dose de imunossupressor e da quantidade do inóculo de *C. parvum*, o que possivelmente resultaria numa maior sobrevivência dos camundongos e numa maior recuperação de oocistos.

Ressaltamos a importância da realização da imunossupressão, já que os camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 que foram infectados sem serem submetidos a corticoterapia (grupos 9 e 10, respectivamente) não eliminaram oocistos nas fezes, indicando que existe uma resistência natural à infecção por *C. parvum*, nas duas linhagens de camundongo estudadas. Essa resistência foi marcante nos camundongos da linhagem BALB/c, que mesmo submetidos à imunossupressão com dexametasona e infectados posteriormente (grupos 2 e 3), não liberaram oocistos nas fezes.

Apesar da quantidade de oocistos recuperados de camundongos ter sido substancialmente menor que a quantidade de oocistos comumente recuperados de bezerros infectados, consideramos viável a manutenção de *C. parvum* por meio de sucessivas passagens em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona.

O modelo murino é de fácil manipulação, mais viável financeiramente e de menor risco de contaminação aos manipuladores e ao meio, e constitui uma alternativa viável para obtenção de parasitos em massa, para serem utilizados em estudos relacionados a aspectos morfológicos, bioquímicos, imunológicos, histopatológicos, terapêuticos e da relação parasito-hospedeiro.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Camundongos da linhagem C57BL/6, quando submetidos à imunossupressão com dexametasona, mostraram-se susceptíveis à infecção por *Cryptosporidium parvum*;

Camundongos da linhagem BALB/c mostraram-se resistentes à infecção por *C. parvum*, mesmo após imunossupressão com dexametasona, não consistindo em um modelo conveniente para manutenção deste parasito;

Oocistos de *C. parvum* recuperados de camundongos infectados, foram capazes de infectar outros camundongos C57BL/6, demonstrando a viabilidade desse modelo de manutenção do parasito;

O modelo animal padronizado em nosso laboratório é uma importante ferramenta para realização de estudos que possam esclarecer as várias lacunas que ainda existem em relação à histopatologia, patogenia, mecanismo de infecção, resposta imune e terapêutica na criptosporidiose;

REF. BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI AA, JONES JT, RIGGS MW, ENRIQUEZ JF. Evidence of thymus-independent local and systemic antibody responses to *Cryptosporidium parvum* infection in nude mice. *Infect. Immun.* 1997; 67: 3947-3951.

ADJEI AA, JONES JT, ENRIQUEZ FJ. Differential intra-epithelial lymphocyte phenotypes following *Cryptosporidium parvum* challenge in susceptible and resistant athymic strains of mice. *Parasitol. Int.* 2000; 49: 119-129.

AGNEW DG, LIMA AAM, NEWMAN RD, WUHIB T, MOORE RD, et al. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. *J. infect. Dis.* 1998; 177:754-760.

AGUIRRE SA, MASON PH, PERRYMAN LE. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 1994; 62(2): 697-699.

AGUIRRE SA, PERRYMAN LE, DAVIS WC, MCGUIRRE TC. IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: Analysis of CD4+ $\alpha\beta$ + IFN- γ + and CD4+ $\alpha\beta$ + IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. *J. Immunol.* 1998; 161: 1891-1900.

ARROWOOD MJ, MEAD JR, MAHRT JL, STERLING CR. Effects of immune colostrums and orally administered antisporezoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. *Infect. Immun.* 1989; 57: 2283-2288.

AWAD-EL-KARIEM FM, ROBINSON HA, DYSON DA, WRIGHT S, FOX MT, MCDONALD V. Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitology* 1995; 110: 129-132.

AYDIN Y, ÖZKUL IA. Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. Vet. Parasitol. 1996; 66: 257-262.

BAKER JR, MULLER R, DOLLINSON D. Opportunistic Protozoa in humans, Adv. Parasitol. 1998; 40: 189-190.

BASKERVILLE A, RAMSAY AD, MILLWARD-SADLER GH, COOK RW, CRANAGE MP. Chronic pancreatitis and biliary fibrosis associated with cryptosporidiosis in simian AIDS. J. Comp. Pathol. 1991; 105: 415-421.

BJORNEBY JM, HUNSAKER BD, RIGGS MW, PERRYMAN LE. Monoclonal antibody immunotherapy in nude mice persistently infected with *Cryptosporidium parvum*. Infect. Immun. 1991; 59: 1172-1176.

BLAGBURN BL, DRAIN KL, LAND TM, MOORE PH, KINARD RG, LINDSAY D S, et al. Dicationic furans inhibit development of *Cryptosporidium parvum* in HSD/ICR suckling Swiss mice. J. Parasitol. 1998; 84(4): 851-856.

BRASSEUR P, LEMETAIL D, BALLETT JJ. Rat model for human cryptosporidiosis. J. Clin. Microbiol. 1988; 26: 1037-1039.

BLANSHARD C, JACKSON AM, SHANSHON DC, FRANCIS N, GAZZARD BG. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. Quart. J. Med. 1992; 85: 813-823.

BUKHARI Z, SMITH HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine faeces. J. Clin. Microbiol. 1995; 33(10): 2592-2595.

CHECKEY W, GILMAN RH, EPSTEIN LD, SUAREZ M, DIAZ JF, CABRERA L, et al. Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. Am. J. Epidemiol. 1997; 145: 156-163.

CHEN W, HARP JA, HARMSSEN AG. Requirements for CD4+ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 1993; 61(9): 3928-3932.

CHEN W, HARP JA, HARP JA, HARMSSEN AG, HAVELL EA. Gamma interferon functions in resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 1993b ; 61: 3548-3551.

CHROUSOS GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunemediated inflammation. *N. Eng. J. Med.* 1995; 332: 1351-1362.

DELAUNAY A, GARGALA G, LI X, FAVENNEC L, BALLETT JJ. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonatal mouse model. *App. Envir. Microbiol.* 2000; 66(10): 4315-4317.

DENG MQ, CLIVER DO. *Cryptosporidium parvum* development in the BS-C-1 cell line. *J. Parasitol.* 1998; 84(1): 8-15.

DILLINGHAM RA, LIMA AA, GUERRANT RL. *Cryptosporidiosis*: epidemiology and impact. *Microbes and infection*, 2002; 4: 1059-1066.

DOYLE PS, CRABB J, PETERSEN C. Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 1993; 61(10): 4079-4084.

EGYED Z, SRÉTER T, SZÉLL Z, VARGA I. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. *Vet. Parasitol.* 2003; 111: 103-114.

ENRIQUEZ J, AVILLA CR, IGNACIO-SANTOS J, TANAKA-KIDO J, VALLEJO O, STERLING CR. *Cryptosporidium* infection in Mexican children: clinical, nutritional, enteropathogenic, and diagnostic evaluations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; 56: 254-257.

ERNEST JA, BLAGBURN BL, LINDSAY DS. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in neonatal mice (*Mus musculus*). J. Parasitol. 1986; 72: 796-798.

FAUCI AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocytes subpopulations. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. Immunol. 1975; 28: 669-680.

FAUCI AS, DALE DC. The effect of *in vivo* hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. J. Clin. Invest. 1974; 53: 240-246.

FAYER R, MORGAN U, UPTON SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Intern. J. Parasitol. 2000; 30: 1305-1322.

FLANIGAN TP, AJI T, MARSHALL R, SOAVE R, AIKAWA M, KAETZEL C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. Infect. Immun. 1991; 59(1): 234-239.

FRANZEN C, MULLER A. Cryptosporidia and Microsporidia – Waterborne Diseases in the immunocompromised host. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 34: 245-262.

GOODMAN & GILMANN. Hormônio adrenocorticotrófico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais Em: As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, Mcgraw-Hill Interamericana editores, S.A., 1996:1090-1091, 9ª. edição,

GUT J, PETERSEN C, NELSON R, LEECH J. *Cryptosporidium parvum* in vitro cultivation in Madin-Darby Canine Kidney cells. J. protozool. 1991; 38: 72S-73S.

HAYWARD AR, CHMURA K, COSYNS M. Interferon- γ is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum*. J. Infect. Dis. 2000; 182: 1001-1004.

HEALEY MC, YANG S, RASMUSSEN KR, JACKSON MK, DU C. Therapeutic efficacy of paromomycin in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. J. Parasitol. 1995; 81(1): 114-116.

HEINE J, MOON HW, WOODMANSEE DB. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (Nude) mice. Infect. Immun. 1984; 43(3): 856-859.

HJAWI NS, MELONI BP, MORGAN UM, THOMPSON RCA. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 1048-1055.

HOJLYING N, MOLBAK K, JEPSEN S. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Liberian children. J. Clin. Microbiol. 1986; 23(6): 1109-1113.

HUNTER PR, NICHOLS G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infections in immunosuppressed patients. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(1): 145-154.

HUNTER CA, SUBAUSTE CS, VAN CLEAVE VH, REMINGTON JS. Production of γ -interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii* - infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor α . Infect. Immun. 1994; 62: 2818-2824.

IVES N, GAZZARD B, EASTERBROOK P. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. Infection 2001; 42: 134-139.

KHAN IA, MATSURA T, KASPER LH. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 1994; 62: 1639-1642.

KOSEC M, ALCANTARA C, LIMA AM, GUERRANT RL. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2001; 1: 262-269.

LACROIX-LAMANDÉ S, MANCASSOLA R, NACIRI M, LAURENT F. Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 2002; 70(4): 2090-2099.

LAURENT F, ECHMANN L, SAVIDGE TC, MORGAN G, THEODOS C, NACIRI M, et al. *Cryptosporidium parvum* Infection of Human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.* 1997; 65(12): 5067-5073.

LAWTON P, NACIRI M, MANCASSOLA R, PETAVY AF. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* in the non-adherent human monocytic THP-1 cell line. *J Eukar. Microbiol.* 1997; 44(6): 66S.

MACDONALD V, BRANCOFT G. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasit. Immunol.* 1994; 16: 315-320.

MANGINI ACS, DIAS RMDS, GRISI SJFE, ESCOBAR AMU, TORRES DMADV, et al. Parasitismo por *Cryptosporidium* sp em crianças com diarreias aguda. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1992; 34: 341-345.

MEAD JR. *Cryptosporidiosis* and the challenges of chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 2002; 5: 47-57.

MEAD JR, YOU X. Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. J. Parasitol. 1998; 84(5): 1045-1048.

MELONI BP, THOMPSON RCA. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. J. Parasitol. 1996; 82(5): 757-762.

MONIS PT, THOMPSON RCA. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? Infection. Gen. Evol. 2003; 3: 233-244.

MORGAN UM, CONSTANTINE CC, O'DONOGHUE P, MELONI BP, O'BRIEN PA, THOMPSON RCA. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52(6): 559-564.

MORGAN UM, FALL A, WARD LA, HIJAWI N, SULAIMAN I, FAYER R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J. Eukaryot. Microbiol. 2002; 49(6): 433-440.

NEUMANN NF, GYÜREK LL, FINCH GR, BELOSEVIC M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 183: 331-336.

NORMAN FN, GYÜREK LL, FINCH GR, BELOSEVIC M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 183: 331-336.

OKAFOR JI, OKUNJI PO. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples of some school children in Enugu State, Nigeria. J. Commun. Dis. 1996; 28: 49-55.

OKHUYSEN PC, RICH SM, CHAPPELL CL, GRIMES KA, WIDMER G, FENG X, et al. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of corvine origin for healthy adults and interferon- γ knockout mice. J. Infect. Dis. 2002; 185: 1320-1325.

OSHIRO ET, DORVAL MEC, NUNES VLB, SILVA MAA, SAID LAM. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. Ver. Soc. Brás. Med. Trop. 2000; 33(3): 277-280.

PANCIERA RJ, THOMASSEN RW, GARNER FM. Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Pathol. 1971; 8: 479-484.

PENG MM, XIAO L, FREEMAN AR, ARROWOOD MJ, ESCALANTE AA, WELTMAN AC, et al. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg. Infect. Dis. 1997; 3(4): 567-573.

PENG MM, WILSON ML, HOLLAND RE, MESHNICK SR, LAL AA, XIAO L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol. Res. 2003; 90: 1758-1790.

PERCH M, SODEMANN M, JAKOBSEN MS, VALENTINER-BRANTH P, STEINSLAND H, FISCHER TK, et al. Seven years' experience with *Cryptosporidium parvum* in Guinea-Bissau, West Africa. Ann. Trop. Paediatr. 2001; 21(4): 313-318.

PERRYMAN LE, KAPIL SJ, JONES ML, HUNT EJ. Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. Vaccine 1999; 17: 2142-2148.

PETERSEN C. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 903-909.

PETRY F, ROBINSON HA, MCDONALD V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1922-1924.

PINTO PLS. Estudos sobre o comportamento do *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 em ratos submetidos a imunossupressão pela metil-prednisolona, 1991: 122. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

REHG JE, HANCOCK ML, WOODMANSEE DB. Characterization of cyclophosphamide-rat model of cryptosporidiosis. Infect. Immun. 1987; 55: 2669-2674.

REHG JE, HANCOCK ML, WOODMANSEE DB. Characterization of a dexamethasone-treated rat model of cryptosporidial infection. J. Infect. Dis. 1988; 158: 1406-1407.

RASMUSSEN KR, HEALEY MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. Infect. Immun. 1992; 60(4): 1648-1652.

RASMUSSEN KR, LARSEN NC, HEALEY MC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. Infect. Immun. 1993; 61(4): 1482-1485.

RIGGS MW. Cryptosporidiosis in cats, dogs, ferrets, raccoons, opossums, rabbits and non-human primates. In: Cryptosporidiosis of man and animals (J.P. Dubey, C.A. Speer and Rr. Fayer, eds), pp 113-120, 1990. Boston: CRC Press.

RIGGS MW, SCHAEFER DA, KAPIL SJ, BARLEY-MALONEY L, PERRYMAN LE. Efficacy of monoclonal antibodies against defined antigens for passive immunotherapy of chronic gastrointestinal cryptosporidiosis. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 2002; 46(2): 275-282.

SALLON S, DECKELBAUM RJ, SCHMID II, HARLAP S, BARAS M, SPIRA DT. *Cryptosporidium*, malnutrition and chronic diarrhea in children. *A.J.D.C.* 1988; 142: 312-315.

SCOTT CA, SMITH HV, MTAMBO MM, GIBBS HA. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. *Vet. Parasitol.* 1995; 57: 277-288.

SHEATER AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *J. Comp. Ther.* 1923; 35: 265-75.

SHERWOOD D, ANGUS KW, SNODGRASS DR, TZIPORI S. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 1982; 38: 471-475.

SLAVIN D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 1955; 65: 262-266.

SMITH LM, BONAFONTE MT, MEAD JR. Cytokine expression and specific lymphocyte proliferation in two strains of *Cryptosporidium parvum*-infected gamma-interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 2000; 86(2): 300-307.

SMITH LM, BONAFONTE MT, CAMPBELL LD, MEAD JR. Exogenous interleukin-12 (IL-12) exacerbates *Cryptosporidium parvum* infection in gamma interferon knockout mice. *Exp. Parasitol.* 2001; 98: 123-133.

TAGHI-KILANI R, SEKLA L, HAYGLASS KT. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium spp.* Infection Studies with B cell-depleted mice. *J. Immunol.* 1990; 145: 1571-1576.

THEODOS CM, SULLIVAN KL, GRIFFITHS JK, TZIPORI S. Profiles of healing and nonhealing *Cryptosporidium parvum* infection in C57BL/6 mice with functional B and T lymphocytes: the extent of gamma interferon modulation determines the outcome of infection. *Infect. Immun.* 1997; 65(11): 4761-4769.

TUMWINE JK, KEKITIINWA A, NABUKEERA N, AKIYOSHI DE, RICH SM, WIDMER G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago hospital, Kampala, Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(6): 710-715.

TZIPORI S, RAND W, GRIFFITHS JK, WIDMER G, CRABB J. Evaluation of an animal model system for cryptosporidiosis: therapeutic efficacy of paramomycin and hyperimmune bovine colostrums-immunoglobulin. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 1994; 1: 450-463.

TZIPORI S, FENG X, WIDMER G, GRIMES KA, CHAPPELL CL, RICH SM, et al. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of corvine origin for healthy adults and interferon- γ knockout mice. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 1320-1325.

TZIPORI S, WARD H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Mic. Infect.* 2002; 4: 1047-1058.

UNGAR BLP, NASH T. Quantification of specific antibody response to *Cryptosporidium* antigens by laser densitometry. *Infect. Immun.* 1986; 53: 124-128.

UNGAR BLP, SOAVE R, FAYER R, NASH TE. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 1986; 153(3): 570-578.

UNGAR BLP, BURRIS JA, QUINN CA, FINKELMAN FD. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect. Immun.* 1990; 58(4): 961-969.

UPTON SJ, TILLEY M, BRILLHART DB. Effects of select medium on "in vitro" development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. J. Clin. Microbiol. 1995; 33(2): 371-375.

UPTON SJ, TILLEY M, NESTERENKO MV, BRILLHART DB. A simple and reliable method of producing "in vitro" infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). FEMS Microbiol. Lett. 1994; 118: 45-50.

URBAN JF, FAYER R, CHEN SJ, GAUSE WC, GATELY MK, FINKELMAN F. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. J. Immunol. 1996; 156: 263-268.

VERGARA-CASTIBLANCO CA, FREIRE-SANTOS F, OTEIZA-LÓPEZ AM, ARES-MAZÁS ME. Viability and infectivity of two *Cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location. Vet. Parasitol. 2000; 89: 261-267.

WATERS WR, HARP JA, WANNEMUEHLLER MJ, CARBAJAL NY, CASAS IA. Effects of *Lactobacillus reuteri* on *Cryptosporidium parvum* infection of gnotobiotic TCR- α -deficient mice. J. Eukaryot. Microbiol. 1999; 46(5): 60S-61S.

WIDMER G, TZIPORI S, FICHTENBAUM CJ, GRIFFITHS JK. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. J. infec. Dis. 1998; 178: 834-840.

WIDMER G, COREY EA, STEIN B, GRIFFITHS JK, TZIPORI S. Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development. J. Parasitol. 2000; 86(5): 922-928.

WOODS KM, NESTERENKO MV, UPTON SJ. Efficacy of 101 antimicrobials and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum* "in vitro". An. Trop. Med. Parasitol. 1996; 90: 603-615.

XIAO L, FAYER R, RYAN U, UPTON SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17: 72-97.

YANG S, HEALEY MC. The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with *Cryptosporidium parvum*. J. Parasitol. 1993; 79(3): 626-30.

YANG S, BENSON SK, DU C, HEALEY MC. Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. J. Parasitol. 2000; 86(4): 884-887.

ZU SX, FANG GD, FAYER R, GUERRANT RL. Cryptosporidiosis: Pathogenesis and Immunology. Parasitol. Today 1992; 8(1): 24-27.

Anexo 1 – Técnica de Kinyoun modificada

Reagentes:

1. Metanol absoluto
2. Álcool ácido
3. 10 ml de ácido sulfúrico + 90 ml de etanol. Estocar a temperatura ambiente
4. Fucsina
5. Verde malaquita a 3%
6. Dissolver 3 g de verde malaquita em 100 ml de água destilada. Estocar a temperatura ambiente.

Procedimento:

1. Preparar uma lâmina com uma a duas gotas da suspensão de fezes e secar a 60°.
2. Fixar com metanol absoluto por 30 segundos.
3. Corar com fucsina por um minuto. Lavar com água destilada e escorrer.
4. Descorar com álcool:ácido por dois minutos. Lavar com água destilada e escorrer.
5. Corar com verde malaquita por dois minutos. Lavar com água destilada e escorrer.
6. Deixar secar a temperatura ambiente.
7. Examinar em aumento de 400X.

Anexo 2-A Apresentação das gaiolas, específicas para isolamento dos camundongos e coleta das fezes.

Anexo 2-B Vista superior das gaiolas nas quais os camundongos foram acomodados

Anexo 2-C Instalação dos camundongos

Anexo 2-D Disposição das fezes no fundo das gaiolas