

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Infecção pelo *Cryptosporidium* sp, linhagem humana MMC, em camundongos C.B-17/Uni scid, C57BL/6/Uni bg, C3H/Uni nu e C57BL/6 KO para INF- γ .

DELMA PEGOLO ALVES

ste exemplar corresponde a redação final
a tese defendida pelo(a) candidato (a)
Delma Pegolo Alves
aprova da pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em
Parasitologia.

Campinas, SP
2004

INIDADE	AL
1ª CHAMADA	UNICAMP
AL87i	
EX	
OMBO BC/	61441
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
REÇO	11.00
ATA	9.1.05
CPD	

0101d 336246

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

AL87i **Alves, Delma Pegolo**
Infecção pelo *Cryptosporidium* sp, linhagem humana MMC, em camundongos C.B-17/Uni scid, C57BL6/Uni bg, C3H/Uni nu e C57BL/6 KO para INF- γ /Delma Pegolo Alves. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.Camundongos- Imunologia. 2.Protozoário. 3.Interferon. 4.Histopatologia.
5.Intestino. I. Guaraldo, Ana Maria Aparecida. II Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III.Título.

Campinas, 10 de Setembro de 2004.

Banca Examinadora

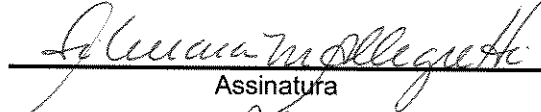
**Profa. Dra.
Ana Maria Aparecida Guaraldo**


Assinatura

**Profa. Dra.
Regina Maura Bueno Franco**

Assinatura

**Profa. Dra.
Silmara Marques Allegretti**


Assinatura

**Prof. Dr.
Francisco Hideo Aoki**


Assinatura

**Prof. Dr.
Rovilson Gilioli**


Assinatura

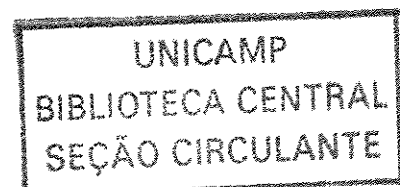
**Prof. Dr.
Paulo Maria Ferreira Araujo**


Assinatura

**Profa. Dra.
Debora Queiroz Tavares**

Assinatura

200509246



**A Deus,
Poder Superior que me ilumina**

**Aos meus amores,
Isabela, Ana Carolina e Adilson**

**Aos meus Pais,
Pela minha formação**

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo pela orientação, incentivo, apoio e amizade. Também pela importante contribuição na minha vida profissional e pelo exemplo de dedicação à Ciência e ao trabalho.

À Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco e Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pelas valiosas sugestões na análise prévia.

À Profa. Dra. Débora Tavares Queiroz da Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, pela orientação e participação na análise histológica.

À Profa. Dra. Leda Quércia Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais, pela doação das matrizes de camundongos C57BL/6 KO para IFN- γ .

Ao Dr. Vicente José Salles de Abreu da USP – Departamento de Pediatria, por sua valiosa ajuda pelo material bibliográfico, para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Rovilson Gilioli do Laboratório de Controle de Qualidade Animal do CEMIB, por ter cedido seu laboratório na fase inicial deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Parasitologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, pelo auxílio e cordialidade.

Ao Marcos Zanfolin, André Pires Benevides e Lenira Aparecida Guaraldo de Andrade, pela disposição e colaboração nas diversas etapas deste trabalho.

À Daniele M. R. Demolin, Sônia C. M. Rachel, Regina Vinagre, Luiz Augusto C. Passos e Armando F. L. Filho, pelo apoio.

Aos técnicos e estagiários das Áreas de Criação de Animais S.P.F. do CEMIB, pela dedicação, disposição e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Ao Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica – CEMIB- UNICAMP.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Resumo

Cryptosporidium é um protozoário oportunista que causa diarreia em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes. A duração e severidade dos sintomas clínicos dependem do sistema imunológico do hospedeiro.

Nas pessoas imunocompetentes, a infecção pode ser assintomática ou induzir uma diarreia autolimitante, enquanto nos indivíduos imunodeficientes, resulta em doença acentuada ou diarreia que pode ser fatal.

O objetivo deste estudo foi avaliar a evolução da infecção experimental pela linhagem MMC, de *Cryptosporidium* sp de origem humana, nas linhagens de camundongos imunodeficientes C57BL/6 KO para IFN- γ , C.B-17/Uni *scid*, C57BL/Uni *bg*, C3H/Uni *nu* e imunocompetentes BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni.

Para tanto, a manutenção do cultivo “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp foi realizada mediante várias passagens em camundongos neonatos imunocompetentes e camundongos adultos KO para IFN- γ . Foram utilizadas fêmeas SPF com 04 a 06 semanas de vida das linhagens imunodeficientes e imunocompetentes, inoculadas com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp por tubagem esofágica. Para a avaliação da dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp, as fezes dos animais foram colhidas diariamente, durante 15 dias e armazenadas em dicromato de potássio 2,5% a 4°C. Para o estudo da patologia intestinal, os animais foram sacrificados no 15º ou 44º dias após a infecção, e retirados segmentos do jejuno, íleo, ceco e colon para posterior avaliação histológica.

A análise conjunta da mortalidade dos camundongos infectados pelo *Cryptosporidium* sp e da eliminação de oocistos indica que o perfil da resistência à infecção nas linhagens em estudo apresentou o seguinte padrão: C57BL/6/Uni > BALB/c/Uni > *scid* > *bg* > nude > KO.

As alterações histológicas no intestino das linhagens estudadas apresentaram um perfil de severidade das lesões na seguinte ordem: KO > *bg* > nude > *scid* > BALB/c/Uni = C57BL/6/Uni.

Dentre as linhagens avaliadas, os camundongos KO foram os mais susceptíveis a infecção pelo *Cryptosporidium* sp, quanto a mortalidade, eliminação de oocistos e alterações histológicas no intestino. A linhagem C57BL/6 KO para IFN- γ pode ser considerada o melhor modelo para o estudo da criptosporidiose experimental. Estes resultados também ressaltam a importância do IFN- γ no controle da criptosporidiose na fase aguda da

infecção, assim como a importância das células NK e linfócitos T no controle da criptosporidiose. A comparação da análise histopatológica do *scid*, nude e *bg* sugerem que a resposta humoral tem pequena participação no controle da criptosporidiose.

Descritores: *Cryptosporidium*; camundongos imunodeficientes; interferon-gama; células natural killer; patologia intestinal.

Abstract

Cryptosporidium is a protozoan parasite that can cause chronic life-threatening diarrhea in immunocompromised persons. In immunocompetent hosts, *C. parvum* causes a self-limiting diarrheal illness that can persist until 3 weeks.

Cryptosporidium sp isolated from a HIV - positive patient in Campinas (Brazil) has been maintained by repeated oocyst passage through S.P.F. suckling mice. Differences in susceptibility to cryptosporidial infections were investigated among four immunodeficient adult mice strains: C57BL/6 gamma-interferon-knockout (KO), C57BL/6/Uni *bg*, C3H/Uni *nu* and C.B-17/Uni *scid*. The mice were infected via oral inoculation with 10^5 *Cryptosporidium* sp MMC oocysts and monitored for infection intensity by collection of fecal pellets from individual mice. After 15 or 44 days, the mice were sacrificed in order to evaluate the damage at distal jejunum, ileum, caecum and colon.

There was differences highly significant in the fecal oocyst shedding among KO, *bg*, *scid*, *nu* and adult immunocompetent controls (C57BL/6/Uni and BALB/c/Uni). The resistance pattern concerning the mortality and oocysts shedding among the mice strains, was: C57BL/6>BALB/c>*scid*>*bg*>nude>KO.

Histological intestinal evaluation 15 days after infection, showed that KO mice showed pronounced histological changes and *scid* mice were less infected. The response of the epithelium to cryptosporidial infection after 44 days showed signals of recovery and it was possible to suggest the following panel concerning the recovery capacity : *scid*>*bg*>nude>KO.

The results of this study demonstrated that there is correlation between resistance pattern and histological alterations. These findings support the view that IFN- γ , T and NK cells are very important for the control of infection mainly during the early recovery phase against *Cryptosporidium* sp infection. The results also suggest that the role of B cells in the resolution of murine infection against *Cryptosporidium* is minor.

Descriptors: gama Interferon; *Cryptosporidium*; immunodeficient mice, natural killer cells ; intestinal pathology.

Lista de Abreviaturas e Siglas

bg - gene beige

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

C. parvum - *Cryptosporidium parvum*

DAB - Diaminobenzidina

d.a.i. - dia após a infecção

HE - Hematoxilina eosina

HIV- Human Immunodeficiency Virus

IFN- γ - Interferon-gama

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

KO - Camundongo Knockout

NK - Células Natural Killer

nu - gene nude

PBS - Phosphate buffer solution

PVC - Polyvinyl chloride

scid - gene Severe combined immune deficiency.

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SPF- Specific Pathogen Free

Th1 - Células T helper 1

Th2 - Células T helper 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

RESUMO	vi, vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ciclo Biológico do <i>Cryptosporidium</i> sp	3
1.2 Transmissão do <i>Cryptosporidium</i> sp	5
1.3 Espécies de <i>Cryptosporidium</i> sp	6
1.4 Genótipos de <i>Cryptosporidium</i> sp	8
1.5 Tratamento da criptosporidiose	9
1.6 Camundongos Imunodeficientes de interesse no estudo da criptosporidiose	11
1.7 Criptosporidiose Experimental	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Obtenção da Linhagem de <i>Cryptosporidium</i> sp	17
3.1.1 Manutenção “in vivo” da linhagem MMC de <i>Cryptosporidium</i> sp	18
3.2 Modelo Experimental	19
3.2.1 Implantação e estabelecimento da Colônia de Camundongos C57BL/6 KO para IFN- γ	19
3.2.2 Monitoramento dos níveis de Imunoglobulina sérica em Camundongos C.B-17/Uni <i>scid</i>	20

3.2.3 Monitoramento das células NK em camundongos C57BL/6/Uni <i>bg</i>	20
3.3. Infecção de camundongos com oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp	21
3.4. Análise Morfométrica de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp	22
3.5. Dinâmica da eliminação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp	22
3.6. Avaliação Histológica	23
3.7 Análise Estatística	23
3.8 Delineamento Experimental	24
4. RESULTADOS	25
Capítulo 1	26
Capítulo 2	44
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7. ANEXOS	85
Anexo I: - Manutenção do Cultivo “in vivo” do <i>Cryptosporidium</i> sp.	86
Anexo II: Alves, D. P., Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A & Zanfolin, M. Capítulo 25 Gnotobiologia IN: Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.211- 224, 2002.	87
Anexo III: Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A., Alves, D. P., Pire, L. A., Santana, T. M., Dini, T. H. C. Capítulo 26 Criopreservação de Embriões Murinos em Biotérios IN: Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.225- 245, 2002.	103
Anexo IV: Protocolo Experimental 428-1- CEEA- Comissão de Ética em Experimentação Animal	126

1. INTRODUÇÃO

Em 1907, Tyzzer descreveu *Cryptosporidium muris* para designar um pequeno protozoário coccídio, encontrado nas glândulas gástricas de camundongo. Posteriormente, em 1912, Tyzzer encontrou uma outra espécie no intestino delgado de camundongo, descrevendo-o como *Cryptosporidium parvum*.

C. parvum é um protozoário do filo Apicomplexa, pertencente a Classe Sporozoasida, sub-classe Coccidiasina; Ordem Eucoccidiorida; Sub-ordem Eimeriorina; Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1988).

A criptosporidiose humana encontra-se documentada em 95 países, em todos os continentes, exceto na Antártica, sendo considerada a zoonose emergente mais importante da atualidade (FAYER et al, 1997).

Os primeiros casos de criptosporidiose humana foram relatados em 1976, sugerindo um comportamento oportunista do parasito em indivíduos imunocomprometidos (MEISEL et al, 1976; NIME et al, 1976).

A criptosporidiose é reconhecida como uma doença diarréica em indivíduos normais e com sistema imunológico comprometido. A infecção pode ser assintomática em indivíduos imunocompetentes, enquanto nos indivíduos portadores de HIV ou outras desordens imunológicas freqüentemente a infecção se torna crônica. (CRAWFORD & VERMUD, 1988).

As formas clínicas da criptosporidiose podem ser divididas em quatro categorias: assintomática, sintomática, crônica e fulminante (GRIFFITHS, 1998). A forma assintomática é importante por causar a transmissão endêmica, tem caráter transitório, com período de incubação de 6 dias e uma duração de 2 a 30 dias, e acomete indivíduos imunocompetentes. Na sintomática são freqüentes a anorexia, diarréia aquosa, desconforto abdominal e febre. A forma crônica é comum nos pacientes HIV positivos, levando à desidratação e agravamento clínico em

indivíduos desnutridos. A forma fulminante é exclusiva em pacientes HIV positivos ou imunossuprimidos devido à terapêutica, apresentando-se como uma doença semelhante ao cólera (GRIFFITHS, 1998).

No estudo realizado por Blanshard et al, 1992, em pacientes infectados pelo HIV, a prevalência de criptosporidiose foi de 5% do total de indivíduos soropositivos para o HIV e 21% dos pacientes com sintomas clínicos. O curso fulminante ocorreu apenas em pacientes cuja contagem de CD4⁺ foi inferior a 50 células/mm³; os pacientes com número de linfócitos T CD4⁺ superior a 200/mm³, não apresentaram criptosporidiose crônica.

A infecção pelo *C. parvum* em camundongo neonato induziu apoptose das células do epitélio intestinal. A primeira evidência de que células epiteliais da base das criptas do íleo sofrem apoptose e a discussão do papel deste mecanismo na patogênese da criptosporidiose foi relatada por Sasahara et al, (2003). Na resposta imunológica, a apoptose é um processo importante na estratégia de defesa, participando da eliminação das células infectadas.

A lesão direta do parasito associada ao recrutamento de células inflamatórias e citocinas, podem ser os fatores de virulência responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas ou funcionais que acarretam a diarreia (OKHUYSEN & CHAPPELL, 2002). Muitos mecanismos estão envolvidos na patogênese da diarreia durante a infecção pelo *Cryptosporidium* sp, tais como atrofia das vilosidades e aumento da produção de prostaglandina pelos leucócitos recrutados na mucosa. De acordo com o nível de IFN- γ produzido durante a criptosporidiose, a permeabilidade intestinal pode sofrer alteração, induzindo a diarreia.

Há controvérsias se existe atividade enterotóxica do *Cryptosporidium* que induza a diarreia (GUARINO et al, 1995).

1.1 Ciclo Biológico do *Cryptosporidium* sp

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* apresenta muitos estágios de desenvolvimento, com ciclos de divisão assexuado, onde ocorrem duas gerações de merontes (meronte tipo I e meronte tipo II), e ciclos de divisão sexuada com formação de macrogametas e microgametas. Após a fecundação, ocorre a formação de oocistos. Dois tipos de oocistos são produzidos: um de parede espessa, que é eliminado para o meio externo, com as fezes e outro de parede delgada, que leva à auto infecção, por romper-se no intestino delgado (Figura 1).

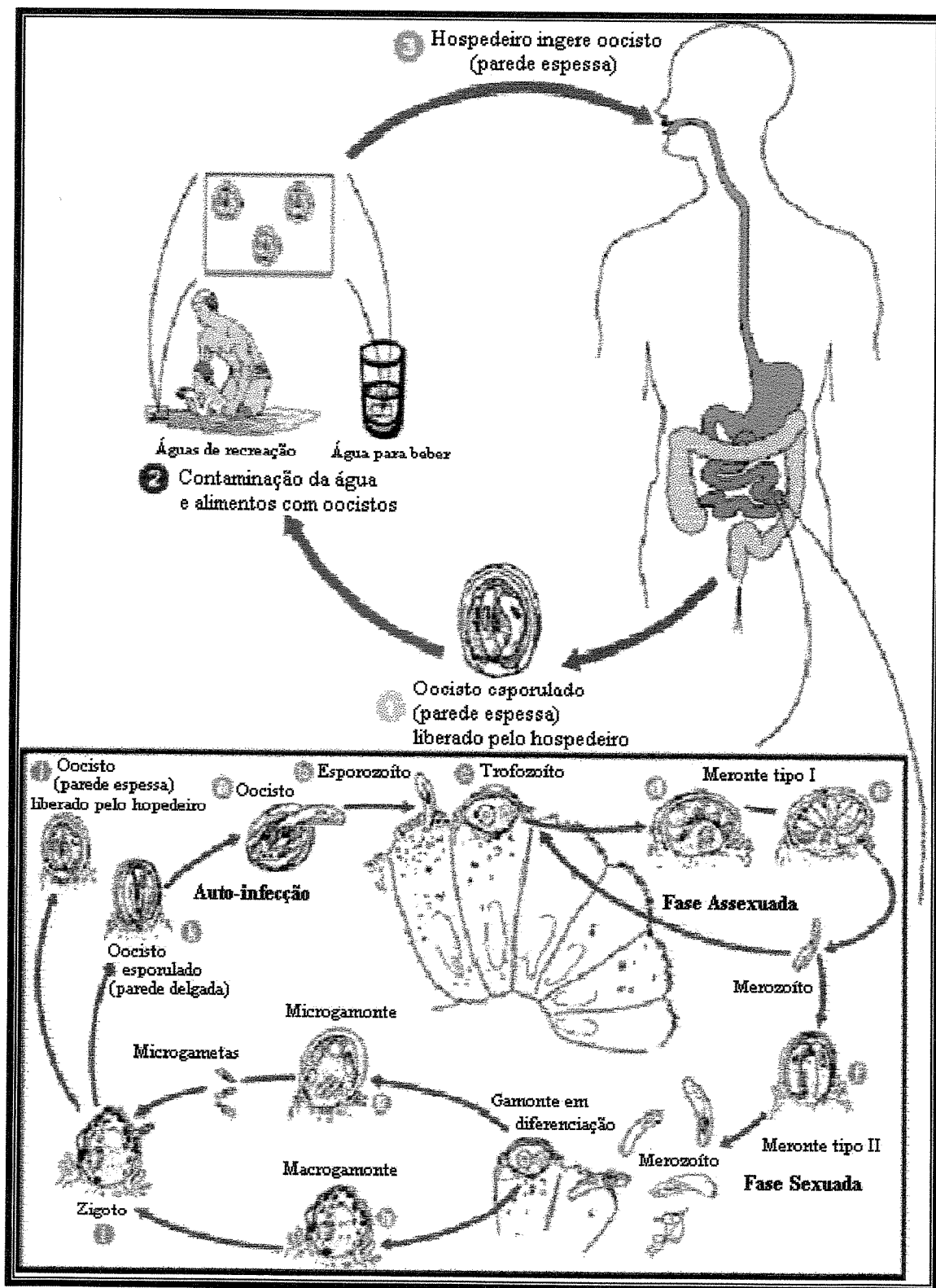


Figura 1 :Ciclo Biológico do *Cryptosporidium* sp (<http://www.cdc.gov>)

1.2 Transmissão do *Cryptosporidium* sp

Smith & Rose 1998, relataram que os surtos de criptosporidiose têm ocorrido devido à transmissão hídrica do *C. parvum*, pois os oocistos não são retidos pelos sistemas de filtros no tratamento da água e são resistentes aos produtos desinfetantes.

Algumas características biológicas do *C. parvum* favorecem a sua transmissão pela água, tais como o tamanho do oocisto, rigidez da parede e sua liberação já esporulada. Um dos maiores surtos de criptosporidiose já registrado ocorreu em abril de 1993, nos Estados Unidos, na cidade de Milwaukee, onde aproximadamente 400.000 pessoas foram infectadas com oocistos de *C. parvum* veiculados pela água (MCKENZIE et al, 1994).

O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), relatou que 71% das doenças veiculadas pela água, no período de 1993 a 1994, foram devido ao *C. parvum* e *Giardia lamblia* (GOSTIN et al, 2000).

Franco et al, 2001, investigaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, na água superficial do Rio Atibaia, na região sudeste do Brasil. Os autores relataram que todas as amostras examinadas foram positivas para ambos os protozoários.

Em 1994, Millard et al, relataram uma epidemia de criptosporidiose em estudantes e funcionários de uma escola que foram contaminados por suco fresco de maçã. A incidência foi de 81% em 759 pessoas. Outros alimentos envolvidos como fonte de infecção de casos humanos foram a salsicha crua, miúdos de carne bovina e leite cru (SODRÉ & FRANCO, 2001).

Franco & Cordeiro, 1996, constatarem a prevalência de 6,4% de *Cryptosporidium parvum* em 310 crianças de 2 a 60 meses em creches de Campinas. O inquérito epidemiológico evidenciou a importância da transmissão

inter-pessoal, pois, 73,6% dos casos positivos incidiram em famílias onde pelo menos um dos pais era profissional da área de saúde.

Um levantamento epidemiológico com 6548 aidéticos de 17 países da Europa, revelou que o principal fator de risco para a criptosporidiose estava associado ao comportamento sexual (PEDERSEN et al, 1996).

Há registros recentes de transmissão de *Cryptosporidium* sp associado ao contato com animais. A pesquisa foi realizada na região de Ljubljana, Slovenia, numa área com 587.000 habitantes durante um período de três anos. Amostras de fezes de 338 indivíduos com enterite aguda foram positivas para *Cryptosporidium* sp. O diagnóstico foi realizado por imunofluorescência e pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Dos 338 casos de criptosporidiose, 49 aconteceram em decorrência de contato direto com animais (STANTIC-PAVLINIC et al, 2003).

1.3 Espécies de *Cryptosporidium* sp

Morgan-Ryan et al, 2002, descreveram uma nova espécie de *Cryptosporidium* baseado em dados biológicos e moleculares. Os autores denominaram a nova espécie de *Cryptosporidium hominis* n. sp. morfologicamente idêntico ao *C. parvum* de genótipo 1 ou humano (H). *C. hominis* tem sido registrado em mamífero marinho (*Dugong dugon*) e ovelhas. Experimentalmente foi possível infectar ovelhas, leitões e gado (XIAO et al, 2004).

Atualmente treze espécies são reconhecidas dentro do gênero *Cryptosporidium* conforme tabela 1.

Tabela 1. Espécies de *Cryptosporidium* reconhecidas, com seus hospedeiros específicos e locais primários de infecção.

Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	Hospedeiro específico predominante	Comprimento do Oocisto (µm)	Largura do Oocisto (µm)	Locais primários de Infecção
<i>C. andersoni</i>	Gado	6,6-8,1	5,0-6,5	Abomaso
<i>C. baileyi</i>	Pássaros	6,0-7,5	4,8-5,7	B. de Fabricius, cloaca
<i>C. felis</i>	Gatos	3,2-5,1	3,0-4,0	Int. Delgado
<i>C. hominis</i>	Homem	4,4-5,4	4,4-5,9	Int. Delgado
<i>C. meleagridis</i>	Pássaro	4,5-6,9	4,2-5,3	Int. Delgado
<i>C. muris</i>	Camundongos	6,5-8,7	4,6-6,3	Estômago
<i>C. nasorum</i>	Peixes	3,5-4,7	4,2-5,0	Estômago, Int. Delgado
<i>C. parvum</i>	152 espécies de mamíferos	4,5-5,4	4,2-5,2	Int. Delgado
<i>C. saurophilum</i>	Lagartixa, lagarto	4,4-5,6	4,2-5,2	Estômago, Int. Delgado
<i>C. serpentis</i>	Muitas espécies de répteis	5,6-6,6	4,8-5,6	Estômago
<i>C. wrairi</i>	Cobaíes	4,8-5,6	4,0-5,0	Int. Delgado
<i>C. canis</i> (*)	Cães	4,95	4,71	-
<i>C. galli</i> (*)	Galinhas	8,25	6,3	células epiteliais do pró-ventrículo
<i>C. molnari</i> (*)	peixes	4,72	4,47	células epiteliais do estômago, raro no Int. Delgado.

Modificado de Carey et al, 2004. (*) Novas espécies conforme Xiao et al, 2004. A espécie *C. nasorum* não é aceita por Xiao et al, 2004.

1.4 Genótipos de *Cryptosporidium* sp

Pereira et al, 2002, compararam a patogenia dos genótipos bovino (BoG2) e humano (HuG1), em porcos “neonatos” gnotobióticos, administrando 1 a 10 oocistos de HuG1 ou BoG2. Os períodos pré-patente e patente foram significativamente maiores para o genótipo HuG1 do que para o genótipo BoG2. Os animais infectados com o genótipo tipo 2 (BoG2), desenvolveram doença severa. Os parasitos foram visualizados no intestino por microscopia durante os períodos pré-patente e patente. Os parasitos do genótipo tipo 1 foram detectados no período patente no íleo e colon, colonizando a superfície da mucosa.

Stantic-Pavlinic et al, 2003, mostraram dois subgenótipos de *C. parvum* bovino (GPB e GPC) no homem, devido ao contato com animais. Os resultados indicaram que existe uma heterogeneidade genética do genótipo bovino de *C. parvum* em área localizada, e o gado pode ser a fonte de infecção para o homem.

A variabilidade genotípica entre a linhagem de *Cryptosporidium* sp humano e de animais foi confirmada por Morgan et al, 1995, mediante a análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). A análise genética da linhagem humana genótipo tipo 1 TU502, transferida para três hospedeiros (homem, porcos e bezerros), apresentou comportamento estável, sem nenhuma evidência da emergência de uma nova subpopulação, como observado através de PCR genótipo-específico. Conforme destacaram Akiyoshi et al, 2002, esta observação é importante, pois, pode ser utilizada no delineamento de projetos de pesquisa nos quais são incluídos estudos em voluntários humanos. O estudo da virulência e infectividade do *C. parvum* em voluntários humanos, teve início em 1993, na Universidade do Texas. Os testes foram realizados com 3 linhagens de *C. parvum* tipo 2, geograficamente distintos. Foi possível determinar a ID₅₀ (infectividade) de oocistos de *C. parvum* da linhagem de Iowa: 132 oocistos (CHAPPELL et al,

1996). Houve diferença entre a ID_{50} das 3 linhagens. Um ano depois, o mesmo grupo de voluntários foi exposto novamente à infecção pelo *C. parvum*. Tanto a duração como a gravidade da diarreia mostraram-se reduzidas. A taxa de infecção, após a re-exposição, foi de 16% (3/19), enquanto no primeiro desafio foi 63% (12/19). Os fatores que contribuem para a patogenicidade do *Cryptosporidium* e determinam a virulência, podem estar associados ao estado imunitário do hospedeiro, espécies distintas do parasito, genótipos, e polimorfismos dentro do mesmo genótipo (CHAMPBELL et al, 2002).

1.5 Tratamento da criptosporidiose

Não há registros de drogas, vacinas ou terapia que sejam efetivas no tratamento da criptosporidiose. A Paramomicina é uma droga utilizada para minimizar os sintomas da criptosporidiose, com redução da eliminação de oocistos (STEINER et al, 1997). A Nitazoxanida (NTZ), conhecida como uma droga antiparasitária, é utilizada no tratamento de helmintos e protozoários, incluindo o *Cryptosporidium* (GILLES & HOFFMAN, 2002).

A eficácia da nitazoxanida e paramomicina foram estudadas em cultura de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), infectada com oocistos de *C. parvum* utilizando-se em dois modelos experimentais (camundongos *scid* anti-interferon-gama e leitões). Por meio de cultura de células foi possível evidenciar a redução de 93% na taxa de crescimento de parasitos tratados com nitazoxanida (10 $\mu\text{g/mL}$) e redução de 80%, quando foi adotada a paramomicina (2000 $\mu\text{g/mL}$). No estudo “in vivo” os camundongos tratados por 10 dias com paramomicina, liberaram poucos oocistos quando comparados com camundongos tratados com nitazoxanida. Os dois grupos de leitões tratados com duas doses diferentes de nitazoxanida e paramomicina apresentaram diarreia. Estas observações sugerem

que a atividade da droga “in vitro” não assegura a mesma eficácia “in vivo” (THEODOS et al, 1998).

Várias investigações relatam o uso da imunoterapia passiva como alternativa para a infecção pelo *Cryptosporidium*. Riggs et al, 2002, concluíram que a imunoterapia passiva tem alta eficácia na redução da gravidade da infecção intestinal em modelos animais imunodeficientes com criptosporidiose persistente.

Nos experimentos realizados por Abreu, 2001, em modelos imunocompetentes neonatos, foi demonstrado que ratos isogênicos da linhagem F 344, tratados com colostro bovino hiperimune ou com colostro bovino normal, reduziram o parasitismo intestinal, com menor comprometimento de mucosa intestinal. Este tratamento utilizando camundongo C57BL/6 acarretou ligeira redução do número de parasitos e não foi possível evidenciar diferenças nas alterações histopatológicas da mucosa intestinal.

A literatura relata o uso do colostro bovino hiperimune em crianças com hipogamaglobulinemia congênita, para remissão da diarreia pela criptosporidiose (TZIPORI et al, 1986). Pacientes HIV positivos que apresentam diarreia pela infecção com *C. parvum*, têm utilizado o colostro bovino hiperimune, para remissão dos sintomas (GREENBERG & CELLO 1996).

A administração de probióticos tem sido adotada para a remissão da diarreia. Em animais de laboratório foi demonstrado que a suplementação com *Lactobacillus reuteri* ou *Lactobacillus acidophilus* reduziu a liberação intestinal de oocistos de *C. parvum* em camundongos imunodeficientes C57BL/6, sugerindo que *Lactobacillus* têm um potencial benéfico como probiótico para a resistência do hospedeiro nas infecções pelo *C. parvum*. *Lactobacillus acidophilus* foi mais eficaz na redução do número de oocistos de *C. parvum* em relação ao *Lactobacillus reuteri*, com potencial de uso no tratamento da criptosporidiose em indivíduos imunossuprimidos, incluindo AIDS (ALAK et al, 1999).

Pickerd & Tuthill 2004, relataram o primeiro caso humano de tratamento com probiótico, em paciente imunocomprometido com criptosporidiose e diarreia aguda, com remissão dos sintomas.

Harp et al, 1996, realizaram um ensaio em área endêmica de criptosporidiose para avaliar medidas profiláticas em bezerros recém-nascidos. Os animais foram divididos em três grupos, e receberam respectivamente uma vacina oral, um tratamento probiótico com ácido láctico e o grupo controle. Os resultados não mostraram diferenças significativas na incidência de diarreia e liberação de oocistos entre os três grupos. Nas condições do campo, nem a vacina nem o tratamento probiótico foram efetivos na prevenção da infecção pelo *C. parvum*, em decorrência da grande quantidade de oocistos presentes no meio ambiente.

1.6 Camundongos Imunodeficientes de interesse no estudo da criptosporidiose

Camundongos *scid*

Bosma et al, 1983, identificaram em camundongos uma mutação recessiva denominada SCID (Severe Combined Immune Deficiency). Posteriormente, esta mutação foi mapeada no cromossomo 16 (BOSMA et al, 1989). Trata-se de uma deficiência nos linfócitos T e B, resultante da atividade defeituosa da recombinase VDJ. As células pró-B aparecem na medula óssea, mas não se desenvolvem em pré-B e células B. No timo são encontrados precursores de células T, mas não são encontradas células CD3⁺ funcionais. Poucos clones de receptor de antígenos, para linfócitos B e T positivos aparecem em proporção variável, entre camundongos *scid* jovens e velhos (BOSMA et al, 1988, CARROL & BOSMA, 1988, CARROL et al, 1989).

O camundongo *scid* é modelo para a investigação das relações entre linfócitos B e T e outras populações de células como macrófagos, células NK (Natural Killer). Este modelo pode ser reconstituído com progenitores de células linfóides normais ou linfócitos maduros, sendo possível o estudo “in vivo” da diferenciação e proliferação das células hematopoiéticas.

Desde a sua descrição, o modelo *scid* tem sido utilizado para o estudo de parasitos como leishmaniose (VARKILA et al, 1993), esquistossomose (AMIRI et al, 1992), filarirose (NELSON et al, 1991), criptosporidiose (McDONALD et al, 1992), giardiose (GOTTSTEIN et al, 1991) e toxoplasmose (JOHNSON, 1992).

Camundongos *nu*

A mutação natural nude (recessiva - cromossomo 11) foi encontrada no Laboratório de Virologia do Hospital Ruchill, Glasgow. Inicialmente foi descrita apenas por causar perda de pelos, com pequena sobrevida e baixa fertilidade (FLANAGAN, 1966). Quando nascem, os animais possuem folículos pilosos normais, e posteriormente ocorre a queratinização no meio do folículo impedindo a erupção de pêlos.

Os camundongos homozigotos apresentam um timo rudimentar (PANTELOURIS, 1968). A ausência do timo leva à depleção de linfócitos nas áreas timo dependentes dos linfonodos e do baço, o que induz grande susceptibilidade às infecções. A população linfocitária é composta praticamente de linfócitos B. Em camundongos *nu* adultos é possível detectar linfócitos T, devido a ocorrência de locais de maturação extra tímica. Este modelo torna-se importante por não rejeitar transplantes alogênicos, xenogênicos e tumores.

Camundongos *bg*

Outro modelo murino de interesse no estudo do *C. parvum*, é o camundongo homozigoto bege (*bg*). A mutação bege (cromossomo 13) foi induzida por radiação no Oak Ridge National Laboratory e também ocorreu espontaneamente na linhagem C57BL/6, no Jackson Laboratory (LANE & MURPHY, 1972).

Os camundongos homozigotos são modelos experimentais para o estudo da Síndrome de Chediak-Higashi (LUTZNER et al, 1967). Nos camundongos homozigotos, a cor dos olhos é clara quando nascem. A pigmentação das orelhas e cauda é reduzida, a pelagem é mais clara. Estes animais apresentam deficiência de células Natural Killer (NK), células T citotóxicas (RODER, 1979). Os camundongos bege são mais susceptíveis às infecções por vírus (SKELLAM et al, 1981), bactérias (ELIN et al, 1974) e parasitas (KIRKPATRICK & FARRELL, 1982).

Camundongos Knockout

As mutações produzidas por engenharia genética “in vitro”, são denominadas de knockout (KO). Os animais knockout apresentam alelos recessivos, não funcionais. Isto ocorre devido a interrupção da sequência codificadora de um gene por uma outra sequência, portanto impede a transcrição normal do gene “desejado” e resulta em um alelo não funcional. Dentre estes animais obtidos por manipulação genética destacamos o KO para IFN- γ , como um modelo promissor no estudo das infecções, principalmente pelo *Cryptosporidium* por infectar se com um baixo número de oocistos (GRIFFITHS et al, 1998).

1.7 Criptosporidiose Experimental

Um problema associado com o estudo experimental de criptosporidiose em mamíferos é que muitas espécies de hospedeiros são susceptíveis à infecção com *C. parvum* somente durante as 3 primeiras semanas de vida (TAGHI-KILANI et al, 1990; UNGAR et al, 1990).

Enriquez & Sterling, 1991, se propuseram a identificar um modelo animal com potencial de uso para o estudo da infecção pelo *C. parvum*. Para tanto, avaliaram 19 linhagens de camundongos adultos e uma de gerbil (*Meriones unguiculatus*). Os resultados mostraram que somente os camundongos bege (C57BL/6J-bg^j) apresentaram números significantes de parasitos no 7º dia após a infecção.

Os modelos imunocompetentes infectados quando neonatos, tais como BALB/c e C57BL/6 apresentam resolução da infecção, no decorrer da maturação do sistema imunológico e da colonização da microbiota associada (SAVAGE et al, 1968; DAVIS et al, 1973; HARP et al, 1988).

A criptosporidiose ocorre em animais de laboratório que são imunologicamente imaturos (ARROWOOD et al, 1989), ratos tratados com drogas imunossupressoras (REHG et al, 1988), camundongos atímicos (HEINE et al, 1984), camundongos neonatos BALB/c tratados com anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 (UNGAR et al, 1990), camundongos NIH-III (bg/nu/xid) (MEAD et al, 1991) e camundongos bg (ENRIQUEZ & STERLING, 1991).

A primeira comunicação de criptosporidiose persistente em camundongos atímicos (nu/nu), neonatos e adultos feita por Heine et al, 1984, evidenciaram a importância das células T durante a infecção.

O modelo *scid* torna-se importante por se infectar de forma crônica com *C. parvum* e desenvolver sintomas similares aos apresentados por pacientes com

imunodeficiência (MEAD et al, 1991). Camundongos *scid* tratados com anti-interferon-gama são usados para o estudo da infecção pelo *C. parvum* na fase aguda, durante os vinte primeiros dias após a infecção com o parasito, quando a infecção é limitada ao trato gastrointestinal. Na fase crônica da doença, do 32º ao 47º dias após a infecção, ocorre comprometimento hepatobiliar e dos ductos pancreáticos (TZIPORI, 1998).

Mead & You, 1998, investigaram a susceptibilidade frente a infecção pelo *C. parvum* por duas linhagens diferentes de camundongos, ambas KO para interferon-gama BALB/c-Ifg^(m)@ e C57BL/6J-Ifg^(m)@. Os camundongos BALB/c-Ifg^(m)@ desenvolveram moderada infecção com média do número de parasitos 100 vezes menor do que o camundongo C57BL/6J-Ifg^(m)@.

Os camundongos KO para interferon-gama são utilizados para o estudo da criptosporidiose, devido ao desenvolvimento de sintomas clínicos e perda de peso. Estes animais se infectam com baixas doses de oocistos de *C. parvum* e são necessários apenas 10 oocistos, para que o animal desenvolva a infecção, sendo um modelo importante para avaliação de drogas terapêuticas (GRIFFITHS et al, 1998).

As características e diferenças imunológicas presentes nas linhagens C57BL/6 KO para IFN- γ , C.B-17/Uni *scid*, C57BL/6/Uni bg e C3H/nu, permitem a avaliação de subpopulações linfocitárias e interferon gama em cada modelo submetido à infecção de uma nova linhagem humana de *Cryptosporidium sp*.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi:

- Avaliar a evolução da infecção experimental pela linhagem MMC, de origem humana de *Cryptosporidium* sp nas seguintes linhagens de camundongos: BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, C.B-17/Uni *scid*, C57BL/6/Uni *bg* , C3H/Uni *nu* e C57BL/6 KO para IFN- γ .

Os objetivos específicos no estudo da criptosporidiose experimental encontram-se enumerados abaixo:

1. Estabelecer a manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongos.
2. Avaliar a dinâmica de eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas linhagens de camundongos imunodeficientes.
3. Estudar a histopatologia do *Cryptosporidium* sp no jejuno, íleo, ceco e colon dos camundongos imunodeficientes e imunocompetentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental 428/1 de 05.07.2002, referente a esta pesquisa, foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da UNICAMP (Anexo IV). O delineamento experimental encontra-se resumido no Quadro I.

3.1 Obtenção da Linhagem de *Cryptosporidium* sp

Conforme relatado por Britto et al, 2000, a linhagem MMC foi isolada a partir de fezes humanas de um único paciente HIV positivo com criptosporidiose. O material obtido de fezes diarreicas foi armazenado em igual volume de dicromato de potássio 5%, a 4° C. As fezes foram filtradas em gaze e tratadas com éter etílico para a retirada da gordura. Em seguida, o material foi lavado, várias vezes em PBS 0,01M, pH 7.2, contendo 0,2% de Tween 20, por centrifugação a 1500 g durante 10 minutos a 4° C. Quando o sobrenadante apresentou-se sem excesso de dicromato de potássio, os precipitados foram ressuspensos em pequenas alíquotas de 2,5 ml. A essas alíquotas adicionou-se 15 ml de solução saturada de sacarose, com densidade de 1,2; essa mistura foi agitada fortemente e colocada para centrifugar a 1.500 g por 10 minutos a 4° C. Logo após, retirou-se a camada superior, que possuía grande parte dos oocistos. Esta camada foi lavada várias vezes em solução de PBS 0,01M, pH 7.2, por centrifugação a 1500 g durante 10 minutos a 4° C. Em seguida, o sedimento foi suspenso em 1mL de PBS 0,01M, pH 7.2. A determinação do número de oocistos/mL foi realizada em câmara de Neubauer, pela diluição da suspensão de oocistos em solução de verde de malaquita a 0,16% contendo 0,1% de SDS, e visualização com microscopia de fase.

3.1.1 Manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp

A linhagem denominada MMC foi mantida em camundongos neonatos S.P.F. (Specific Pathogen Free), imunocompetentes isogênicos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17/Uni e heterogênicos da linhagem Swiss/Uni no período de dezembro/1999 a julho/2002. De novembro/2002 a fevereiro/2004, a linhagem MMC foi mantida em camundongos de 04 a 06 semanas de idade da linhagem C57BL/6 KO para IFN- γ (ANEXO I). Todos os camundongos utilizados para a manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp foram provenientes do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica. A manutenção “in vivo” do *Cryptosporidium* foi realizada em ambiente controlado, em isolador com manejo preconizado por Passos & Alves (1996). Os oocistos foram obtidos do intestino dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção. Foi realizada a maceração do intestino em homogeneizador de Biozzi, em PBS 0,01M pH 7.2. Em seguida foi realizada a filtração em malhas de nylon e centrifugação 2 a 3 vezes a 1500 g, por 10 minutos a 4°C. A camada superior do precipitado foi recolhida para determinação do número de oocistos, conforme o método preconizado por PEETERS & VILLACORTA (1995). Foi realizada a diluição da suspensão dos oocistos (20 μ L) em solução de verde de malaquita (80 μ L), contendo SDS. O número de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, e visualizados sob com microscopia de contraste de fase, utilizando objetiva de 40X. Em cada etapa da infecção experimental foi retirada uma alíquota da suspensão dos oocistos e armazenada em dicromato de potássio a 2,5% a 4° C.

Durante a manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp, em alguns períodos houve a interrupção da infecção. Quando este período era superior a 6 meses, foi feito um “pool” das suspensões dos oocistos armazenados

em dicromato de potássio a 2,5%, referente às alíquotas anteriores. Este “pool” foi centrifugado várias vezes, e seguia-se as etapas anteriores já descritas. A camada superior do precipitado era recolhida para determinação do número de oocistos, conforme descrito anteriormente.

3.2 Modelo Experimental

Para o estudo da dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp e patologia intestinal, foram utilizadas fêmeas com 4 a 6 semanas de idade, S.P.F. provenientes do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, das seguintes linhagens de camundongos:

-imunodeficientes C.B-17/Uni *scid* e respectivo controle imunocompetente BALB/c/Uni

- imunodeficientes C57BL/6 Knockout (KO) para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, e C57BL/6/Uni *bg* e respectivo controle imunocompetente C57BL/6/Uni

A colônia das linhagens citadas foram monitorizadas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB conforme recomendação de Gilioli et al, (1996); Gilioli et al, (2000).

3.2.1 Implantação e estabelecimento da Colônia de Camundongos C57BL/6 KO para IFN- γ

Em 2001, o CEMIB recebeu da Universidade Federal de Minas Gerais 03 matrizes de camundongos Knockout para IFN- γ com background de C57BL/6. Após pequena expansão da colônia, os animais foram submetidos à derivação cesariana, em condições assépticas em unidades isoladoras de PVC flexível tipo Trexler (Anexo II e Anexo III).

3.2.2 Monitoramento dos níveis de Imunoglobulina sérica em Camundongos C.B-17/Uni *scid*

As amostras de sangue dos camundongos *scid* foram obtidas individualmente através de punção retro-orbital, sob anestesia leve. Os níveis de imunoglobulinas nos soros obtidos foram determinados pelo método de Immunoblot (GORDON et al, 1991). Um volume de 5µL de cada soro obtido foi colocado para reagir individualmente com membrana de nitrocelulose previamente sensibilizadas com IgG de carneiro anti-IgG de camundongo. Após a incubação, a 37° C durante uma hora, foi realizada a lavagem com PBS, Tween 20 0,005%. Em seguida foi adicionado o conjugado anti-IgG camundongo com Peroxidase, diluído 1:1.000 em PBS gelatina 0,25%. Após a incubação a 37° C por uma hora, foi realizada a lavagem em PBS, Tween 20 0,05% e a reação revelada com solução cromogênica contendo H₂O₂ e diaminobenzidina (DAB). Foram utilizadas como controles positivo e negativo da reação, respectivamente IgG de camundongo purificada em diferentes concentrações (de 0,15 µg/mL a 15 µg/mL) e PBS. Nos experimentos foram utilizados camundongos SCID com nível de imunoglobulina sérica inferior a 2,5 µg/mL .

3.2.3 Monitoramento das células NK em camundongos C57BL/6/Uni *bg*

Para a validação do camundongo homozigoto *bg*, foi usada a técnica de fosfatase ácida. De cada animal foi feita a punção da cauda para obtenção do esfregaço sanguíneo, que foi fixado em acetona por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de tampão acetato de sódio 0,05M com β-glicerofosfato mais nitrato de chumbo em estufa a 37° C, durante 1 hora. As

lâminas foram lavadas três vezes com água destilada. Em seguida foram imersos durante 2 minutos em solução de sulfeto de amônia 1%, preparada em capela no momento de uso. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas seis vezes com água destilada, para serem coradas com eosina 0,5% durante 5 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas e após a secagem, observou-se ao microscópio óptico comum que as células coradas com eosina ficaram róseas e algumas com pontos pretos, indicando reação fosfatase ácida positiva evidenciando grandes linfócitos granulocitos, denominados células natural killer.

Na manutenção desta linhagem, considera-se o acasalamento entre animais bg/bg (com pelagem mais clara) com animais bg/+ (fenótipo normal).

3.3. Infecção de camundongos com oocistos de *Cryptosporidium* sp

Fêmeas SPF com 04 a 06 semanas de vida, provenientes do CEMIB, foram infectadas com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp por tubagem esofágica. Foram utilizados 16 animais de cada uma das seguintes linhagens: C.B-17/Uni *scid*, C57BL/6 KO para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*, controles BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni.

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Parasitologia da UNICAMP, em isolador. Após os experimentos, os materiais retirados do isolador foram tratados antes do descarte, como padrão de biossegurança. Para a descontaminação os materiais de laboratório foram submetidos a fervura durante 15 minutos, antes da lavagem. Os dejetos retirados do equipamento foram enviados para inativação em equipamento para tratamento de resíduos de serviço de saúde, mediante ondas eletromagnéticas.

Neste estudo foram considerados “resistentes” os animais que apresentaram liberação de oocistos, de *Cryptosporidium* sp na fase aguda da doença e não apresentaram mortalidade, no período de 15 dias.

3.4. Análise Morfométrica de oocistos de *Cryptosporidium* sp

Para a análise morfométrica dos oocistos da linhagem MMC, foi utilizado o material obtido do intestino dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção, conforme metodologia descrita no item 3.1.1. Foram feitos esfregaços do intestino e fezes durante as primeiras 28 passagens da infecção, período de dezembro/1999 a julho/2000. Os esfregaços foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). As medidas de 35 oocistos foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica, em microscópio Zeiss. Os resultados foram expressos como média (desvio padrão) e índice de forma, conforme XIAO et al, (2004).

3.5. Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp

As fezes dos animais adultos infectados foram colhidas diariamente, durante 15 dias, individualmente e armazenadas em dicromato de potássio a 2,5%, mantidas a 4°C. Posteriormente, as amostras de fezes foram centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se a camada superior, para a contagem dos oocistos adicionando-se solução de verde de malaquita a 0,16%, contendo 0,1% de SDS. O número de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, sob microscopia de contraste de fase (PEETERS & VILLACORTA, 1995).

O peso corporal individual dos camundongos, devidamente identificados por marcação auricular, foi registrado em balança semi-analítica, no início e ao final deste experimento.

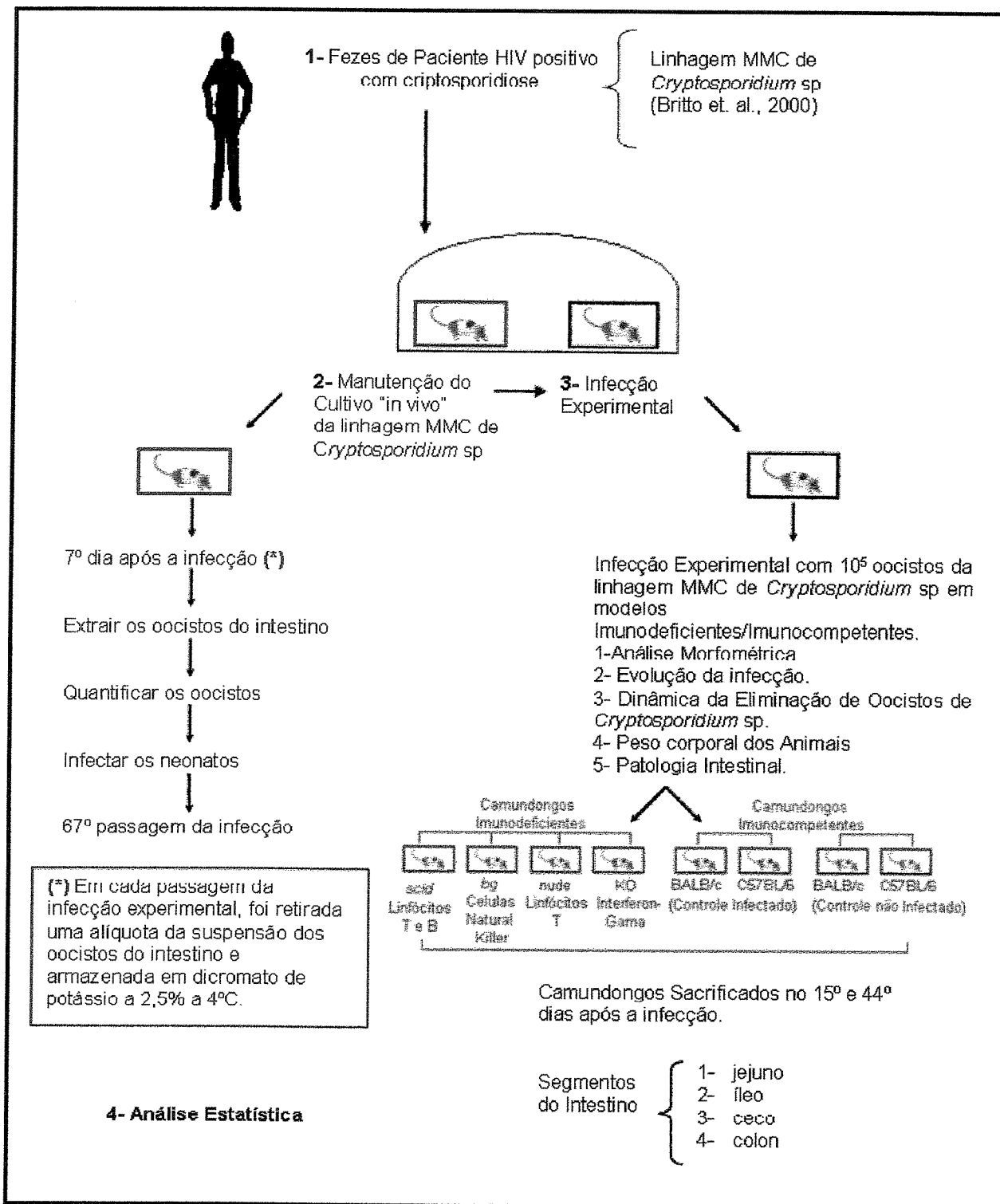
3.6 Avaliação Histológica

Seis animais de cada uma das linhagens de camundongos estudadas foram sacrificados por deslocamento cervical, no 15º ou 44º dias após a infecção. Os segmentos do intestino (jejuno, íleo, ceco e colon) foram imersos em fixador Bouin aquoso. O tecido foi incluído em parafina para cortes de 5µm e corados com HE (Hematoxilina-eosina). Para a captura de imagem, os cortes histológicos foram fotografados em Microscópio Zeiss Axioplan, acoplado ao microcomputador com software Axiophoto 2.

3.7 Análise Estatística

O estudo estatístico da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. foi realizado mediante a comparação das médias obtidas em cada uma das amostras, referente aos dias 6º, 9º, 12º e 15º dias após a infecção. Este período está associado com a mortalidade dos animais e eliminação dos oocistos nas fezes. Foi utilizado o procedimento de Análise de Variância (ANOVA) e comparações pareadas pelo método de Tukey, com nível de confiança de 95%. As análises foram realizadas através do software estatístico *Minitab* – Versão 13.

3.8 Delineamento Experimental



Quadro I - Delineamento Experimental

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de artigo para publicação:

Capítulo 1: Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes.

Autores: ALVES, D. P.; BRITTO, M. H. S. S.; GUARALDO, A. M. A.

Submetido à publicação, em 15.06.2004, na revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, indexada nas seguintes bases de dados: AGRIS (International Information System for the Agricultural Sciences and Technology) da FAO e AGROBASE (Base de Dados da Agricultura Brasileira).

Capítulo 2: Patologia intestinal em camundongos imunodeficientes infectados com a linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp.

Autores: ALVES, D. P. & GUARALDO, A. M. A.

Este artigo será submetido à publicação.

Capítulo 1

**DINÂMICA DA ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* sp
EM LINHAGENS DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES.**

* Delma Pegolo Alves – CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – Unicamp. INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

* Maria Helena Seabra Soares de Britto – Departamento de Farmácia – Universidade Federal do Maranhão. INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Ana Maria Aparecida Guaraldo - CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – Unicamp. Departamento de Parasitologia, INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

* Doutorado em Parasitologia, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

1. INTRODUÇÃO

Em 1907, TYZZER descreveu *Cryptosporidium muris* para designar um pequeno protozoário coccídio, encontrado nas glândulas gástricas de camundongo. TYZZER, em 1912, descreveu uma nova espécie *Cryptosporidium parvum*. Por meio de infecção experimental em camundongos, ele demonstrou que o *C. parvum* desenvolvia somente no intestino delgado, e os oocistos eram menores em relação aos oocistos do *C. muris*. (FAYER et al, 1997).

Somente em 1976 foram relatados os dois primeiros casos de criptosporidiose humana, sugerindo um comportamento oportunista do parasito em indivíduos imunocomprometidos (NIME et al, 1976).

Em indivíduos imunocompetentes e com sistema imunológico comprometido, a criptosporidiose é reconhecida como uma importante doença diarreica. Geralmente a infecção pode ser assintomática em indivíduos imunocompetentes, enquanto nos indivíduos portadores de HIV ou outras desordens imunológicas, freqüentemente a infecção se torna crônica (TZIPORI et al, 1986).

As características clínicas da criptosporidiose são bem descritas. A doença pode apresentar quatro formas: assintomática, importante por causar a transmissão endêmica, transitória ocorrendo em indivíduos imunocompetentes, com período de incubação de 6 dias e uma duração de 2 a 30 dias. Na forma sintomática são freqüentes a anorexia, diarreia aquosa, desconforto abdominal e febre. A forma crônica é comum nos pacientes HIV positivos, levando à desidratação e agravamento clínico em indivíduos desnutridos. A forma fulminante é exclusiva de pacientes HIV positivos ou imunossuprimidos devido à terapêutica, apresentando-se como uma doença semelhante ao cólera (GRIFFITHS, 1998).

Morgan-Ryan et al, 2002, descreveram uma nova espécie de *Cryptosporidium*, considerando as diferenças biológicas e moleculares, denominando a de *Cryptosporidium hominis*. Anteriormente, esta espécie era conhecida como genótipo humano de *C. parvum*, genótipo 1 ou genótipo H.

Alguns estudos consideram que esta nova espécie não infecta camundongos, ratos, cães e bezerros. Porém, a infecção com o *C. hominis* foi reportada em mamífero marinho *Dugong dugon* e ovelhas, experimentalmente foi demonstrada em ovelhas, gado e leitões (XIAO et al., 2004).

Os surtos de criptosporidiose têm ocorrido devido a transmissão do *C. parvum* pela água, pois os oocistos não são retidos pelos sistemas de filtros no tratamento da água e são resistentes aos produtos desinfetantes (SMITH & ROSE, 1998).

Um dos maiores surtos de criptosporidiose já registrado ocorreu em abril de 1993, nos Estados Unidos, na cidade de Milwaukee, onde aproximadamente 400.000 pessoas foram infectadas com oocistos de *Cryptosporidium parvum* veiculados pela água (MCKENZIE et al, 1994).

Franco et al, 2001, realizaram uma investigação sobre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, na Região Sudeste do Brasil, em água superficial do rio Atibaia. Os autores relataram que todas as amostras examinadas foram positivas para ambos os protozoários.

Experimentalmente a criptosporidiose ocorre em animais de laboratório que são imunologicamente imaturos, ratos tratados com drogas imunossupressoras, camundongos atímicos, camundongos tratados com anticorpos anti-CD4, camundongos NIH-III (bg/nu/xid) e camundongos bg (TZIPORI & GRIFFITHS, 1998).

Um problema associado com o estudo experimental da criptosporidiose em mamíferos é que muitas espécies de hospedeiros são susceptíveis à infecção com

C. parvum durante as três primeiras semanas de vida (UNGAR et al, 1990). Os camundongos imunocompetentes das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados ao nascer, apresentam resolução da infecção no decorrer da maturação do sistema imunológico e da colonização da microbiota associada (HARP et al, 1988).

Enriquez & Sterling, 1991, se propuseram a identificar um modelo animal com potencial de uso para o estudo da infecção pelo *C. parvum*. Para tanto, avaliaram 19 linhagens diferentes de camundongos adultos e uma de gerbil (*Meriones unguiculatus*). Os resultados mostraram que somente os camundongos bege (C57BL/6J-bg^j), apresentaram números significantes de oocistos no 7º dia após a infecção.

O modelo *scid* torna-se importante por se infectar cronicamente com *C. parvum* e desenvolver sintomas similares aos apresentados por pacientes com imunodeficiência (MEAD, et al, 1991). Camundongos *scid* tratados com anti-interferon-gama são usados para o estudo da infecção pelo *C. parvum*, na fase aguda durante os vinte primeiros dias após o desafio com o *C. parvum*, quando a infecção é limitada ao trato gastrointestinal. Na fase crônica da doença, do 32º ao 47º dias após a infecção pelo *C. parvum*, ocorre comprometimento hepatobiliar e dos ductos pancreáticos (TZIPORI et al, 1995).

Os camundongos knockout (KO) para IFN- γ (interferon-gama), são utilizados para o estudo da criptosporidiose, devido ao desenvolvimento de sinais clínicos e perda de peso. Estes animais se infectam com baixas doses de oocistos de *C. parvum*, com apenas 10 oocistos o animal desenvolve a infecção, tornando-se um modelo importante para avaliação de drogas terapêuticas (GRIFFITHS et al, 1998).

Com base nas diferenças imunológicas entre as linhagens de camundongos C57BL/6 KO para IFN- γ , C.B-17 *scid*, C57BL/6 *bg* e C3H *nu*, o presente estudo

tem como objetivo a avaliação da dinâmica da eliminação de oocistos da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp em animais adultos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental nº428/1 referente a esta pesquisa foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas.

2.1 Manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp

Conforme relatado por Britto et al, 2000, a linhagem MMC foi isolada a partir de fezes humanas de um único paciente HIV positivo com criptosporidiose, do Hospital das Clínicas da Unicamp. A manutenção desta linhagem foi realizada em camundongos neonatos S.P.F. (Specific Pathogen Free), imunocompetentes isogênicos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17/Uni e heterogênico da linhagem Swiss/Uni no período de dezembro/1999 a julho/2002. A partir de novembro/2002 a fevereiro/2004, a linhagem MMC foi mantida em camundongos de 04 a 06 semanas de idade da linhagem C57BL/6 KO para IFN- γ . A manutenção “in vivo” do *Cryptosporidium* sp foi realizada em ambiente controlado, no isolador, com manejo preconizado por Passos & Alves (1996). Os oocistos foram obtidos do intestino dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção. Foi realizada a maceração do intestino em homogeneizador de Biozzi, com solução salina tamponada 0,01M pH 7.2. Em seguida foi realizada a filtração em malhas de nylon e centrifugação 2 a 3 vezes a 1500 g, por 10 minutos a 4°C. A camada superior do precipitado foi recolhida para determinação do número de oocistos (PEETERS & VILLACORTA, 1995). Foi feita a diluição da suspensão dos oocistos (20 μ L) em solução de verde de malaquita (80 μ L), contendo SDS. O

nº de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, com microscopia de contraste de fase, utilizando objetiva de 40X.

2.2 Infecção de camundongos imunodeficientes com oocistos de *Cryptosporidium* sp

Fêmeas SPF com 04 a 06 semanas de vida , provenientes do CEMIB, foram infectadas com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp por tubagem esofágica. Foram utilizados 10 animais de cada uma das seguintes linhagens imunodeficientes:

- C.B-17/Uni *scid*; linhagem imunocompetente controle BALB/c/Uni
- C57BL/6 KO para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*; linhagem imunocompetente controle C57BL/6/Uni.

As colônias das linhagens citadas foram monitorizadas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB, com metodologia descritas por Gilioli et al, 1996 e Gilioli et al, 2000.

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Parasitologia da UNICAMP, em unidade isoladora de PVC flexível tipo Trexler. Após os experimentos, os materiais retirados do isolador foram tratados antes do descarte, como padrão de biossegurança. Para a descontaminação, os materiais de laboratório foram submetidos a fervura durante 15 minutos, antes da lavagem. Os dejetos retirados do equipamento foram enviados para inativação em equipamento para tratamento de resíduo de serviço de saúde mediante ondas eletromagnéticas.

Para este estudo foram considerados “resistentes” os animais que apresentaram liberação de oocisto de *Cryptosporidium* sp na fase aguda da doença e não apresentaram mortalidade, no período de 15 dias.

2.3 Análise Morfométrica de oocistos de *Cryptosporidium* sp

Para a análise morfométrica dos oocistos da linhagem MMC, foi utilizado o material obtido do intestino e fezes dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção, conforme metodologia descrita (item 2.1). Foram feitos esfregaços durante as primeiras 28 passagens da infecção, no período de dezembro/1999 a julho/2000. Os esfregaços foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). As medidas de 35 oocistos foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica, em microscópio Zeiss. Os resultados foram expressos como média (desvio padrão), e índice de forma conforme XIAO et al, (2004).

2.4 Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp

As fezes dos animais adultos infectados foram colhidas diariamente, durante 15 dias, individualmente e armazenadas em dicromato de potássio na concentração final de 2,5%, mantidas a 4°C. Posteriormente, as amostras de fezes foram centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se a camada superior, para a contagem dos oocistos adicionando-se solução de verde de malaquita a 0,16%, contendo 0,1% de SDS. O número de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, sob microscopia de contraste de fase (PEETERS & VILLACORTA, 1995). O peso corporal individual dos camundongos, devidamente identificados por marcação auricular, foi registrado em balança semi-analítica, no início e ao final do experimento.

2.5 Análise Estatística

O estudo estatístico da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp foi realizado mediante a comparação das médias obtidas em cada uma das amostras, referente aos dias 6^o, 9^o, 12^o e 15^o após a infecção. Este período está associado com a mortalidade dos animais e eliminação dos oocistos nas fezes. Foi utilizado o procedimento de Análise de Variância (ANOVA) e comparações pareadas pelo método de Tukey, com nível de confiança de 95%. As análises foram realizadas no software estatístico *Minitab* – Versão 13.

3. RESULTADOS

A dimensão de 35 oocistos de *Cryptosporidium* sp (média e desvio padrão), foram as seguintes: comprimento $4,91 \pm 0,44 \mu\text{m}$ e largura $5,85 \pm 0,35 \mu\text{m}$. O índice de forma (C/L) obtido foi 0,84.

Foi possível estabelecer a manutenção do cultivo “in vivo” da linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongos neonatos imunocompetentes, e camundongos adultos C57BL/6 KO para IFN- γ . Esta linhagem de *Cryptosporidium* sp encontra-se na 67^o passagem da infecção e mantém alta infectividade.

Para a implantação e manutenção do cultivo “in vivo” do *Cryptosporidium* sp, correspondente ao período de Dezembro/1999 a fevereiro/2004, foram utilizados 1265 animais, entre camundongos neonatos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17 /Uni, Swiss/Uni, e camundongos adultos C57BL/6 KO para IFN- γ , em ambiente controlado (Fig.1).

Considerando a taxa de mortalidade nos animais imunodeficientes e imunocompetentes (Tabela I), não houve morte na linhagem SCID, assim como no

controle. Os camundongos nude, KO e *bg* apresentaram mortalidade no 11º dia após infecção.

Tabela I – Mortalidade de camundongos imunodeficientes e imunocompetentes infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Linhagens de Camundongos	Mortalidade (%)
C.B-17/Uni scid	0
BALB/c/Uni	0
C57BL/6 KO para IFN- γ	40
C57BL/6/Uni <i>bg</i>	20
C3H/Uni nu	40
C57BL/6/Uni	0

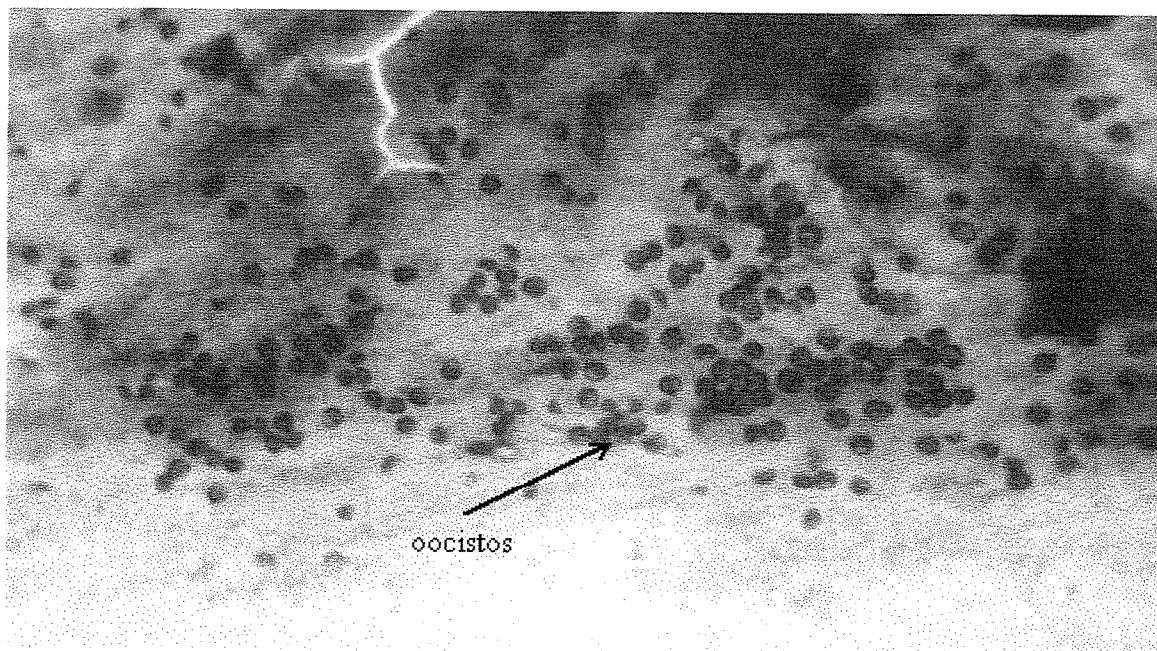


Fig. 1 Oocistos da linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp em esfregaço de suspensão fecal de camundongos neonatos da linhagem BALB/c/Uni. Coloração Ziehl-Neelsen. Aumento 40X .

O comportamento das linhagens imunodeficientes e imunocompetentes, quanto a liberação de oocistos nas fezes, é mostrado na Fig. 2.

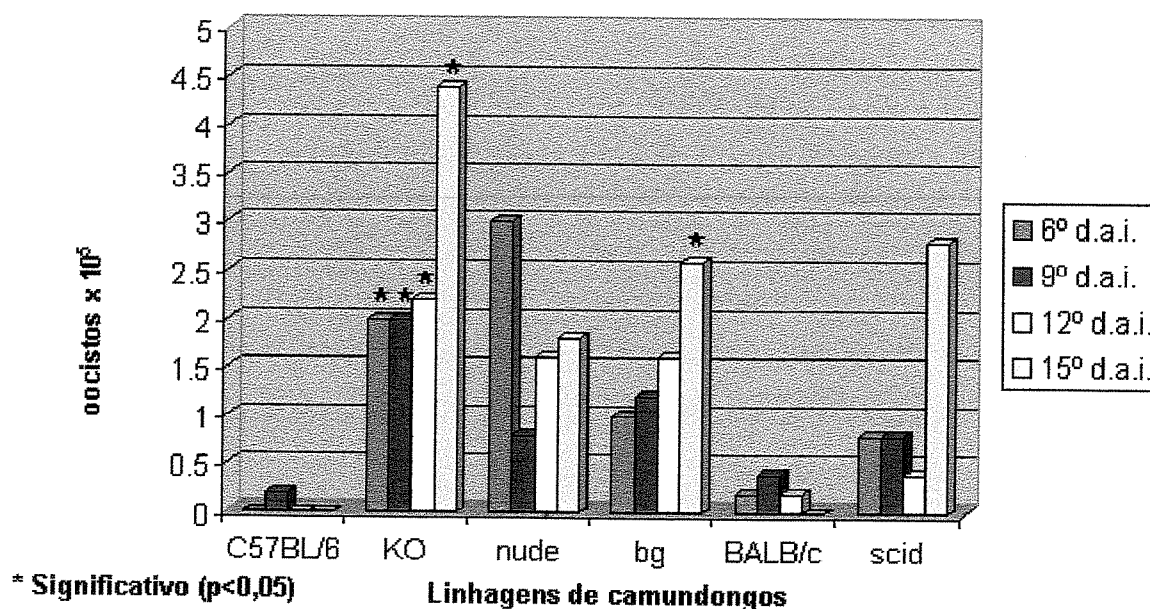


Figura 2 - Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em camundongos imunodeficientes: KO, nude, SCID, bg e imunocompetentes BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni no 6º, 9º, 12º e 15º dia após a infecção (d.a.i.) com 10^5 oocistos.

4. DISCUSSÃO

A manutenção da linhagem de origem humana de *Cryptosporidium* sp em camundongos SPF, ainda não foi descrita no Brasil e tornou-se uma fonte de antígeno para diagnóstico da criptosporidiose.

Um dos fatores limitantes para entender a biologia do *C. parvum* é a dificuldade de obtenção de amostras purificadas de vários estágios de desenvolvimento intracelular do parasito. Conseqüentemente, muitas pesquisas com o parasito procuram caracterizar e identificar os antígenos expressos na superfície das formas invasivas, tais como esporozoítos e merozoítos (WIDMER et al, 2002).

O isolamento da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongo propicia a padronização de um genótipo, possivelmente humano como fonte de antígenos para diagnóstico e infecção de cultura de células.

Atualmente são reconhecidas treze espécies de *Cryptosporidium* (XIAO et al, 2004). As medidas obtidas dos oocistos da linhagem MMC, comprimento $4,91 \pm 0,44\mu\text{m}$ e largura $5,85 \pm 0,35\mu\text{m}$ sugerem que a linhagem MMC, de origem humana se enquadra dentro da espécie *Cryptosporidium hominis*, conforme CAREY et al, 2004. No entanto, o índice de forma (C/L) obtido foi de 0,84, divergindo das observações de XIAO et al, 2004, que indica para *C. hominis* índice de forma 1,15. Porém, a análise morfométrica não pode ser usada como ferramenta para classificação das espécies de *Cryptosporidium*, pois além dos parâmetros biológicos, deve-se considerar principalmente as diferenças genéticas (MORGAN-RYAN et al, 2002; FALL et al, 2003).

A hipótese de se tratar de *Cryptosporidium hominis*, pode ser sustentada pelos resultados de Mclauchlin et al, 1999, quando comparado com *C. parvum*.

Outra diferença entre *C. hominis* e *C. parvum* é quanto a liberação de oocistos. O estudo conduzido por Mclauchlin et al, 1999, em 218 pacientes, com diagnóstico de diarreia, demonstrou que os pacientes que apresentaram infecção pelo *C. hominis* liberaram maior quantidade de oocistos, em relação aos pacientes que se infectaram pelo *C. parvum*.

Todos os camundongos utilizados neste estudo foram classificados na categoria VAF (Virus Antibody Free), pelos resultados de monitorização sanitária. Desta forma foi assegurada a infecção “in vivo” sem a interferência de outros patógenos murinos. Poucos são os relatos de interferência do *Cryptosporidium* na pesquisa experimental associado a outros patógenos em camundongos. Há autores que relataram o efeito sinérgico do *Cryptosporidium parvum*, isolado CPB-0, com rotavírus em leitões SPF (ENEMARK et al, 2003).

Dentre as linhagens de camundongos imunodeficientes estudadas, a linhagem *scid* apresentou resistência à infecção pelo *Cryptosporidium* sp, quando comparada com as outras linhagens imunodeficientes. Os nossos resultados corroboram com Hayard et al, 2000, que comprovaram a importância do IFN- γ para a sobrevivência do *scid*.

Mead & You, 1998, investigaram a susceptibilidade frente a infecção pelo *C. parvum* entre duas linhagens diferentes de camundongos, ambas KO para interferon-gama (BALB/c-Ifg^(m)@ e C57BL/6J-Ifg^(m)@). Os camundongos BALB/c-Ifg^(m)@ desenvolveram infecção moderada com média de eliminação de oocistos 100 vezes menor em relação ao camundongo C57BL/6J-Ifg^(m)@.

O estudo da ação de citocinas durante a infecção pelo *Cryptosporidium parvum* em camundongos knockout (KO) para IL-4, IL-10, IL12 e CCR5, com background de BALB/c, evidenciou as diferenças entre as linhagens, pois os animais KO mostraram-se resistentes (CAMPBELL et al, 2002). Os autores também observaram que o KO para IL-12, com “background” de C57BL/6,

quando infectado com 100 oocistos, apresentou alta susceptibilidade, liberando grandes quantidades de oocistos, em relação as outras linhagens knockout. Após duas semanas o KO para IL-12 foi capaz de controlar a infecção, sugerindo que a IL-12 é um importante indutor de IFN- γ .

Os camundongos nude mostraram controle parcial da infecção. Nossos resultados encontram respaldo nos trabalhos de Rasmussen & Healey, 1992, foi demonstrado que a ausência de linfócitos T em modelos animais estabelece a infecção pelo *Cryptosporidium parvum*. Conforme descrito pelos autores, os camundongos CD4⁻ apresentam perfil de infecção semelhante aos camundongos nude.

Ungar et al, 1991, avaliaram o papel de INF- γ , células CD4 e CD8 em camundongos adultos BALB/c nude submetidos a tratamento com anticorpo monoclonal. Os autores demonstraram que o controle da infecção requer a produção de IFN- γ e contribuição do linfócito CD4. Na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Criptosporidium* sp, também é acionado um mecanismo independente de linfócitos T, no qual os macrófagos ativados induzem a secreção de IFN- γ , pelas células NK (BANCROFT & KELLY, 1994).

A análise estatística da eliminação de oocistos no decorrer da infecção evidenciou que a linhagem KO para IFN- γ apresentou significativamente maior liberação de oocistos em todos os períodos. A linhagem nude superou a linhagem controle apenas no 6º dia após infecção, apresentando diferenças significativas em relação à linhagem *scid*. No 15º dia após infecção, houve diferença significativa entre as linhagens de camundongos *bg* e *scid* comparada aos respectivos controles. É importante destacar que a linhagem imunocompetente mais refratária à infecção foi C57BL/6/Uni, que apresentou oocistos apenas no 9º dia, enquanto a linhagem BALB/c/Uni apresentou oocistos no 6º, 9º e 12º dias após a infecção.

A literatura relata que as linhagens de *Cryptosporidium* sp estudadas até o momento, mesmo as de origem humana, são mantidas em bezerros, por vários anos. No estudo de Griffiths et al, 1998, utilizando o camundongo KO para IFN- γ com “background” C57BL/6, o pico de eliminação de oocistos aconteceu no 9º dia após a infecção. Em nossos resultados, a linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp, no mesmo modelo evidenciou maior eliminação de oocistos no 6º dia após a infecção, uma característica que sugere tratar-se genótipo humano.

Foi possível constatar que não houve controle da infecção pela linhagem KO, enquanto a linhagem *bg* apresentou uma resposta tardia quanto à eliminação dos oocistos associada a significativa perda de peso no 15º dia após a infecção (dados não mostrados).

A análise conjunta da mortalidade dos camundongos imunodeficientes infectados pelo *Cryptosporidium* sp. e da eliminação de oocistos (Fig.2) indica que o perfil de resistência à infecção nas linhagens estudadas obedece o seguinte padrão: C57BL/6/Uni > BALB/c/Uni > *scid* > *bg* > nude > KO.

Os resultados indicam a importância do interferon-gama, linfócitos T e células NK na resistência à infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANCROFT, G.J. & KELLY, J.P. Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID mice. **Immunobiology**, v.191, p.424-31, 1994.
- BRITTO, M.H.S, ALVES, D.P. FREITAS, F.F.T. & GUARALDO, A.M.A. Isolamento de *Cryptosporidium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado humano em camundongos. IN: Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VII, 3-6/12/2000, Campinas.
- CAMPBELL, L.D., STEWART, J.N. & MEAD, J.R. Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine and chemokine-receptor knockout mice. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.1014-16, 2002.
- CAREY, C.M., LEE, H. & TREVORS, J.T. Biology persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v.38, p.818-862, 2004.
- ENEMARK, H.L., BILLE-HANSEN, V. , LIND P., HEEGAARD P.M., VIGRE, H., AHRENS, P. & THAMSBORG, S M. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*- evaluation of an animal infection model. **Veterinary Parasitology**, v. 113 p.35-37, 2003.
- ENRIQUEZ, F.J., & STERLING, C.R. *Cryptosporidium* Infections in inbred strains of mice. **Journal Protozoology**, v.38, p.100-02, 1991.
- FALL, A., THOMPSON, R.C., HOBBS, R.P., MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. **The Journal of Parasitology**, vol.89, p.399-402, 2003.
- FAYER, R., SPEER, C. & DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*, p.1-41. IN: R. Fayer (ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Inc., Boca Taton, Fla. 1997.
- FRANCO, R.B., ROCHA-EBERHARDT, R. & CANTUSIO NETO, R. Ocurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, v.43, p.109-111, 2001.

- GILIOLI, R., SAKURADA, J.K., ANDRADE, L. A.G., KRAFT, V., MEYER, B. & RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Laboratory Animal Science**, v.46, p.582-84, 1996.
- GILIOLI, R., ANDRADE, L.A.G., PASSOS, L.A.C., SILVA, F.A., RODRIGUES, D.M., GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.33-37, 2000.
- GRIFFITHS, J.K. Human Cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Advances in Parasitology**. v.40, p. 37-85, 1998.
- GRIFFITHS, J.K., THEODOS, C., PARIS, M., & TZIPORI, S. The gamma interferon gene Knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p. 2503-2508, 1998.
- HARP, J.A., WANNEMUEHLER, M.W., WOODMANSEE, D.B. & MOON, H.W. Susceptibility of germ-free or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. **Infection And Immunity**, v.56, p. 2006-2010, 1988.
- HENRIKSEN, S.A., POHLENZ, J.F.L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinary Scanddinavian**, v.22, p.594-596, 1981.
- MACKENZIE, W.R., N.J. HOXIE, M.E. PROCTOR, M.S. GRADUS, K.A. BLAIR, D.E. PETERSON, J.J. KAZMIERCZAK, D.G. ADDISS, K.R. FOX, J. B. ROSE, ET AL. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.
- McLAUHLIN, J., S. PEDRAZA-DIAZ, C. AMAR-HOETZENEDER & G.L. NICHOLS. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3153-3158, 1999.

- MEAD, J.R., ARROWOOD, M.J., SIDWELL, R.W. & HEALEY, M.C. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. **The Journal Of Infectious Diseases**, v.163, p.1297-1304, 1991.
- MEAD, J.R. & YOU, X. Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. **The Journal Of Parasitology**, v. 84, p.1045-1048, 1998.
- MORGAN-RYAN, U.M., FALL, A., WARD, L.A., HIJJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R.C., OLSON, M., LAL, A., XIAO L., *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.49, p. 433-440, 2002.
- NIME, F., BUREK, J., PAGE, D., HOLSCHER, M. & YARDLEY, J. Acute enterocolitis in a human infected with the protozoan *Cryptosporidium* **Gastroenterology**, v.70, p.592-598, 1976.
- PASSOS, L.A.C. & ALVES, D.P. Isoladores. IN: Manual para Técnicos em Bioterismo. De Luca, RR., Alexandre, SR., Marques, T., Souza, NL., Merusse, JLB. e Neves, S. P. (eds) 2^a ed. São Paulo, p.27-34, 1996.
- PEETERS, J. & VILLACORTA, I. *Cryptosporidium*. IN: EUR 16602 – Guidelines on Techniques in coccidiosis research. J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert Ed. Luxembourg. p. 202-240, 1995.
- RASMUSSEN, K. & HEALEY, M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. **Infection And Immunity**, v.60, p. 1648-1652, 1992.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.
- TZIPORI, S., ROBERTON, D., CHAPMAN, C., - Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **British Medical Journal**, v.293, p.1276, 1986.

- TZIPORI, S., RAND, W. & THEODOS, C. Evaluation of a two-phase a scid mouse model preconditioned with anti-interferon-gamma monoclonal antibody for drug testing against *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, p. 1160-1164, 1995.
- TZIPORI , S. & GRIFFITHS, J. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum* . IN: Advances in Parasitology – Opportunistic Protozoa in Humans. Baker, J.R., Mullrt, R., Rollinson, D. & Tzipori, S. eds. Academic Press Ltd. London, v.40, p.6-36, 1998.
- UNGAR, B.L, BURRIS, J., QUINN, C. & FINKELMAN, F. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infection and Immunity**, v.58, p. 961-969, 1990.
- UNGAR, B.L., KAO, T.C., BURRIS, J.A. & FINKELMAN, F.D. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. **The Journal of Immunology**, v.3, p.1014-1022, 1991.
- WIDMER, G., LIN, L., KAPUR, V., FENG, X. & ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infections** v4, p. 1081-1090, 2002.
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U. & UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

Capítulo 2

PATOLOGIA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES INFECTADOS COM A LINHAGEM HUMANA MMC de *Cryptosporidium* sp.

* Delma Pegolo Alves - CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – Unicamp. INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Ana Maria Aparecida Guaraldo - CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – Unicamp. Departamento de Parasitologia, INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

- Doutorado em Parasitologia, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

RESUMO

A infecção com o coccídio do gênero *Cryptosporidium*, tem sido relatada no homem e nos animais . Este protozoário infecta o trato gastrointestinal causando a criptosporidiose.

A criptosporidiose tem sido reconhecida como o agente causador da diarreia em indivíduos com sistema imunológico comprometido, principalmente em pacientes HIV positivos. Nos indivíduos imunocompetentes, o *Cryptosporidium* pode causar uma diarreia auto limitante, que pode persistir até 3 semanas.

A patogenicidade intestinal da linhagem MMC de *Cryptosporidium*, isolada de paciente HIV positivo, na cidade de Campinas, foi estudada em 4 diferentes linhagens de camundongos adultos imunodeficientes: C.B-17/Uni *scid*, C57BL/6 KO para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*, infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp por tubagem esofágica. Os animais foram sacrificados no 15º ou 44º dia após a infecção para análise histológica. A patogenicidade foi analisada no jejuno, íleo, ceco e colon associada com a dinâmica da eliminação de oocistos.

No 15º dia após a infecção, os resultados dos camundongos KO evidenciaram acentuada alteração histológica, sendo que os camundongos *scid* foram mais resistentes. O perfil de severidade histopatológica da infecção resultou na seguinte sequência: KO>*bg*>nude>*scid*. Após o 44º dia de infecção, a capacidade de recuperação do epitélio intestinal foi máxima na linhagem *scid* e mínima em nude e KO.

Nossos resultados sugerem que o IFN- γ , células NK e células T , são mais importantes do que linfócitos B no controle da infecção durante a fase aguda da criptosporidiose.

Descritores: *Cryptosporidium*; interferon-gama; camundongos Knoukout; patogenicidade; histologia.

ABSTRACT

Infections with coccidia of the genus *Cryptosporidium* have been reported in animals and humans. This protozoan parasite infects the gastrointestinal tract of animals and humans, causing Cryptosporidiosis.

Due to emergence of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), cryptosporidiosis was recognized as a causative agent of diarrhea in individuals with impaired immune systems. However, in immunocompetent hosts, *Cryptosporidium* causes a self-limiting diarrheal illness that can persist until 3 weeks.

Intestinal pathogenicity of the isolate named MMC of *Cryptosporidium* sp from patient HIV+, was studied in 4 different mice immunodeficient strains. C57BL/6 gamma-interferon-knockout (KO), C57BL/6/Uni *bg*, C3H/Uni *nu* and C.B-17/Uni *scid* were infected via oral inoculation with 10^5 oocysts. Mice were euthanized after 15 or 44 days after infection for histologic analysis. Pathogenicity was analysed at distal jejunum, ileum, cecum and colon associated with the kinetics of oocyst shedding.

Histological intestinal examination 15 days after infection, showed that KO mice exhibited pronounced histological changes and *scid* mice were less infected. The sequence of alterations intestinal due to infection was KO>*bg*>nude>*scid*. The response of the epithelium to cryptosporidial infection after 44 days showed signals of recovery. It was possible to suggest the following panel concerning the recovery capacity: *scid* > *bg* > nude > KO.

These results support the view that IFN- γ , Natural Killer and T cells are more important than B cells for the control of infection during the early phase against *Cryptosporidium* sp infection.

Descriptors: *Cryptosporidium*; gamma-interferon-knockout; mice; pathogenicity; histological.

1. INTRODUÇÃO

Cryptosporidium é um protozoário coccídio, oportunista que causa diarreia tanto em indivíduos imunocompetentes como em indivíduos imunodeficientes. A duração e severidade dos sintomas clínicos dependem da resposta imunológica do hospedeiro.

Na infecção sintomática, em indivíduos imunocompetentes, ocorre diarreia líquida com ou sem muco, raramente com sangue ou leucócitos, perda de peso e desidratação. Outros sintomas relatados são: dor abdominal, febre moderada ($<39^{\circ}\text{C}$), náusea, vômito, dores de cabeça, fadiga e anorexia.

A criptosporidiose em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em pacientes HIV positivo, está associada com diarreia, que é frequentemente mais severa do que em pacientes imunocompetentes, sendo um fator que pode levar à morte. Nestes indivíduos, a diarreia sintomática é marcada por grandes volumes de fezes que excedem seis litros por dia. Nos indivíduos imunodeficientes, o protozoário pode colonizar locais extraintestinais do hospedeiro como esôfago, estômago, fígado, pâncreas, vesícula biliar e conjuntiva do olho. Na infecção respiratória, ocorre tosse, respiração ofegante com chiado e rouquidão. Infecções em outros locais podem resultar em hepatite, pancreatite, colecistite e conjuntivite. As alterações histológicas nas infecções entéricas está bem caracterizada pela atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria. Similar infiltração de células inflamatórias tem sido reportada em outros órgãos (FAYER et al, 1997).

A diarreia tem sido explicada por alguns mecanismos, como disruptura da superfície das microvilosidades, levando a menor absorção intestinal e digestão (BIRD & SMITH, 1980). Outro mecanismo é a atividade de uma enterotoxina

produzida pelo parasita ou hospedeiro (ARGENZIO et al, 1993; OKHUYSEN & CHAPPELL, 2002).

Eichelbeger et al, 2000, avaliaram a participação de linfócitos T gama-delta na mucosa intestinal de camundongos com criptosporidiose. Os autores mostraram que há aumento na proporção de células T gama-delta na lâmina própria em camundongos infectados e estas células contribuem para a proteção do hospedeiro.

Na resposta à infecção, o hospedeiro pode ativar um mecanismo no qual a resposta das células T helper (Th), será direcionada para citocinas mediadas por células Th1 inflamatórias, IFN- γ e IL-12. A resposta por células Th2 auxiliares está associada com produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (ABBAS et al, 1996). Na criptosporidiose, anticorpos anti-IFN- γ administrado em camundongos imunocompetentes, induz aumento na reprodução do parasito. A eliminação do parasito tem como fator importante a IL-12 e IFN- γ (THEODOS et al, 1997).

As citocinas pro-inflamatórias também estão envolvidas no mecanismo da diarreia, através do aumento da permeabilidade do epitélio induzindo a produção de prostaglandinas (GAGINELLA et al, 1995).

Os antígenos de adesão na superfície do parasito atuam na junção do esporozoíto com a célula do hospedeiro, para a formação do vacúolo parasitóforo. As moléculas de adesão, como CSL associada com o complexo apical do esporozoíto e merozoíto e outros fatores de adesão CP47, CPS-500, GP900, GP15/45/60, GP25-200 auxiliam na fixação do parasito na célula do hospedeiro (CAREY et al, 2004).

Considerando a importância de sub-populações linfocitárias no controle da criptosporidiose e a existência de modelos animais com deficiência de determinados clones celulares, julgamos oportuno avaliar as alterações intestinais em camundongos imunodeficientes SCID, KO para interferon gama, nude e bg infectados com oocistos de *Cryptosporidium* sp da linhagem humana MMC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental (428/1) referente a esta pesquisa foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

2.1 Manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp

Conforme relatado por Britto et al, 2000, a linhagem MMC foi isolada a partir de fezes humanas de um único paciente HIV positivo com criptosporidiose, do Hospital das Clínicas da Unicamp. A manutenção desta linhagem foi realizada em camundongos neonatos S.P.F. (Specific Pathogen Free), imunocompetentes isogênicos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17/Uni e heterogênico da linhagem Swiss/Uni no período de dezembro/1999 a julho/2002. A partir de novembro/2002 a fevereiro/2004, a linhagem MMC foi mantida em camundongos de 04 a 06 semanas de idade da linhagem C57BL/6 KO para IFN- γ . A manutenção “in vivo” do *Cryptosporidium* sp foi realizada em ambiente controlado, no isolador, com manejo preconizado por Passos & Alves (1996). Os oocistos foram obtidos do intestino dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção. Foi realizada a maceração do intestino em homogeneizador de Biozzi, com solução salina tamponada 0,01M pH 7.2. Em seguida foi realizada a filtração em malhas de nylon e centrifugação 2 a 3 vezes a 1500 g, por 10 minutos a 4°C. A camada superior do precipitado foi recolhida para determinação do número de oocistos (PEETERS & VILLACORTA, 1995). Foi feita a diluição da suspensão dos oocistos em solução de verde de malaquita a 0,16%, contendo 0,1% de SDS. O nº de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, com microscopia de contraste de fase, utilizando objetiva de 40X.

2.2 Modelo Experimental

Foram utilizadas fêmeas com 4 a 6 semanas de idade provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp livres de patógenos específicos (SPF) das linhagens de camundongos imunodeficientes:

- C.B-17/Uni *scid*; linhagem imunocompetente (controle) BALB/c/Uni
- C57BL/6 KO para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*; linhagem imunocompetente (controle) C57BL/6/Uni.

As colônias das linhagens citadas foram monitorizadas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB, com metodologia descritas por Gilioli et al, 1996 e Gilioli et al, 2000.

2.3 Infecção Experimental

Fêmeas SPF com 04 a 06 semanas de idade, provenientes do CEMIB, foram infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp mediante tubagem esofágica. Foram utilizados 6 animais de cada uma das seguintes linhagens: KO para IFN- γ , nude, *scid*, *bg*, BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni.

O mesmo procedimento foi adotado para infecção de neonatos de BALB/c/Uni, de ambos os sexos, de 2 a 3 dias de vida. Os neonatos foram sacrificados no sétimo dia de infecção e o intestino delgado foi processado para avaliação histológica.

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Parasitologia da Unicamp. Após os experimentos, os materiais foram retirados do isolador e tratados antes do descarte, como padrão de biossegurança. Os materiais de laboratório foram submetidos à fervura durante 15 minutos, e os dejetos contaminados foram enviados para inativação, em equipamento para tratamento de resíduo de serviço de saúde, mediante ondas eletromagnéticas

2.4 Avaliação Histológica

Seis animais de cada linhagem de camundongos estudada foram sacrificados por deslocamento cervical, no 15º ou 44º dias após a infecção. Segmentos do intestino (jejuno, íleo, ceco e colon) foram imersos em fixador Bouin aquoso. Da mesma forma foram preparados os tecidos de 6 neonatos com 7 dias de infecção. Após inclusão em parafina, foram feitos cortes de 5 µm e corados com HE (Hematoxilina-eosina). Para a captura de imagem, os cortes histológicos foram fotografados em Microscópio Zeiss AXIOPLAN, acoplado ao microcomputador com software AXIOPHOTO 2.

3. RESULTADOS

Os animais do grupo controle das linhagens BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni, infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp, após o 15º dia de infecção, mostraram-se sensíveis nas porções apicais das vilosidades, sem gravidade de erosão profunda (prancha I). No 44º dia após a infecção, as duas linhagens apresentaram recuperação plena (prancha II)

As pranchas III, IV, V e VI referem-se respectivamente a avaliação histológica de jejuno, íleo, ceco e colon dos camundongos *scid* , KO, *nu* e *bg* no 15º e 44º dia após a infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

O ceco de todas as linhagens imunodeficientes no 15º dia após a infecção, apresentou um quadro de infecção aguda. No 44º dia, todas as linhagens apresentaram recuperação parcial (prancha V). Por tratar-se de um órgão pouco responsivo, o ceco não foi incluído na tabela I.

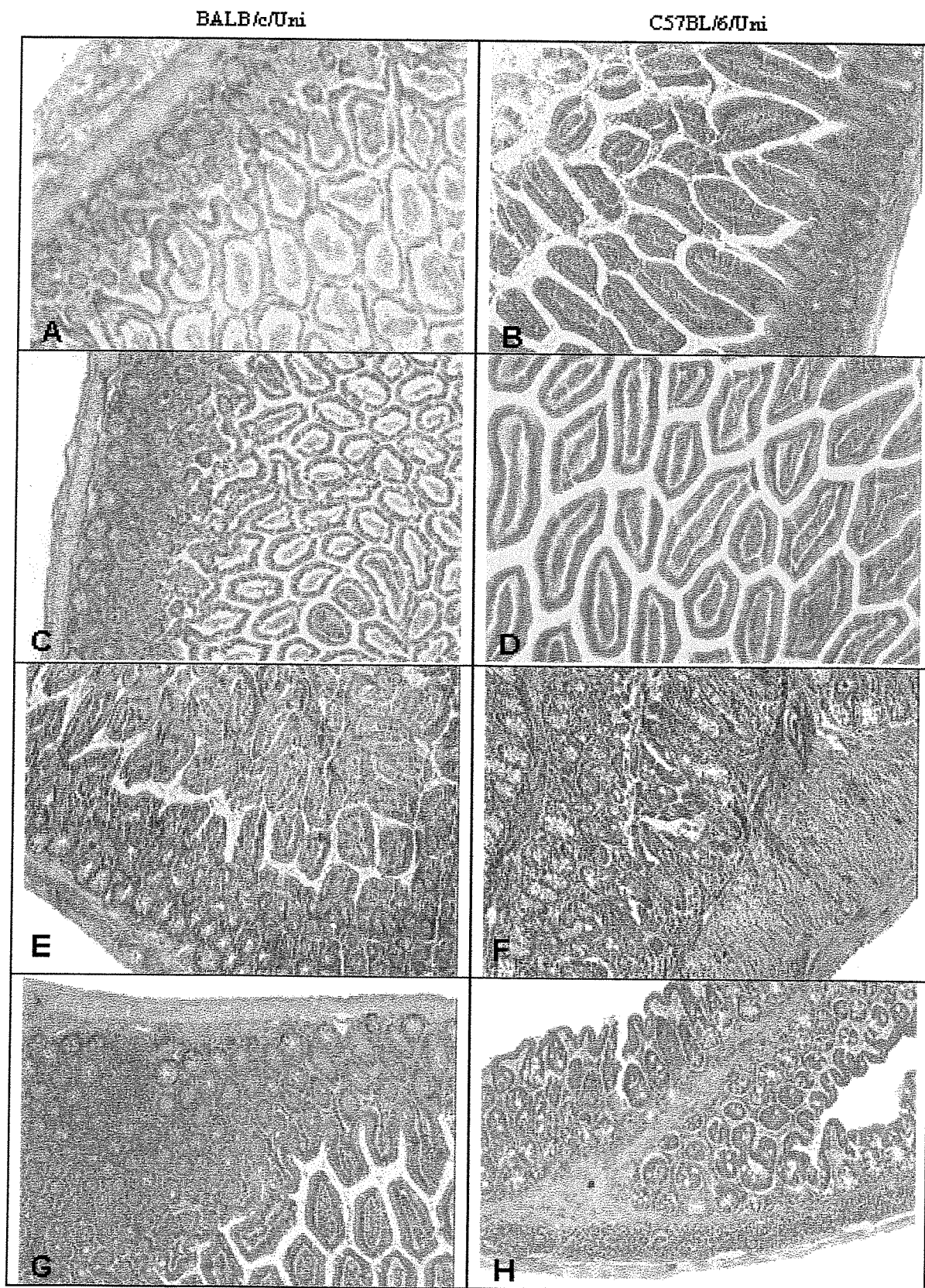
A avaliação histológica do intestino delgado de camundongos neonatos imunocompetentes da linhagem BALB/c/Uni no 7º dia após a infecção com 10^5

oocistos de *Cryptosporidium* sp, mostrou uma infecção aguda precoce, com destruição das vilosidades e quadro de erosão profunda; os camundongos KO apresentaram o mesmo quadro de infecção aguda no jejuno (prancha VII).

Os segmentos do intestino delgado e colon dos camundongos da linhagem *scid* foram avaliados no 70º dia após a infecção, evidenciando plena recuperação (prancha VIII).

Na Tabela 1 encontra-se o quadro resumido da fase de infecção e as principais alterações histológicas encontradas no: jejuno, íleo e colon das linhagens *scid*, KO, *nu* e *bg* no 15º e 44º dia após a infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

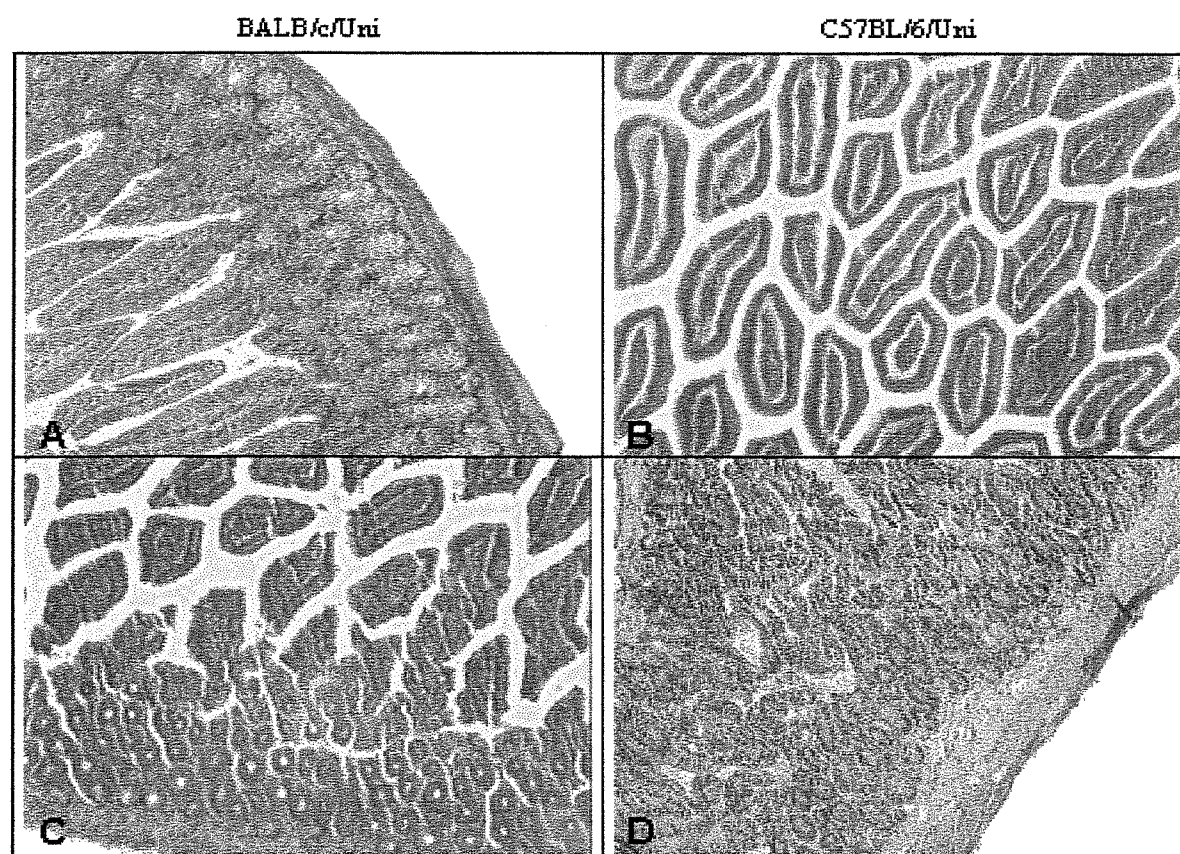
Prancha I - Microfotografia de jejuno, íleo, ceco e colon de camundongos BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni no 15º dia após a infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Aumento objetiva 10x. BALB/c/Uni – jejuno – responde à infecção, próximo esfoliação do epitélio (A), C57BL/6/Uni – jejuno – sensível à infecção, lise parcial da porção apical das vilosidades (B), BALB/c/Uni – íleo – sensível à infecção (C), C57BL/6/Uni – íleo – sensível a infecção com pouca lise das vilosidades na porção apical (D), BALB/c/Uni – ceco – sensível a infecção (E), C57BL/6/Uni – ceco – recuperação (F), BALB/c/Uni – colon- recuperação (G), C57BL/6/Uni – colon – recuperação (H).



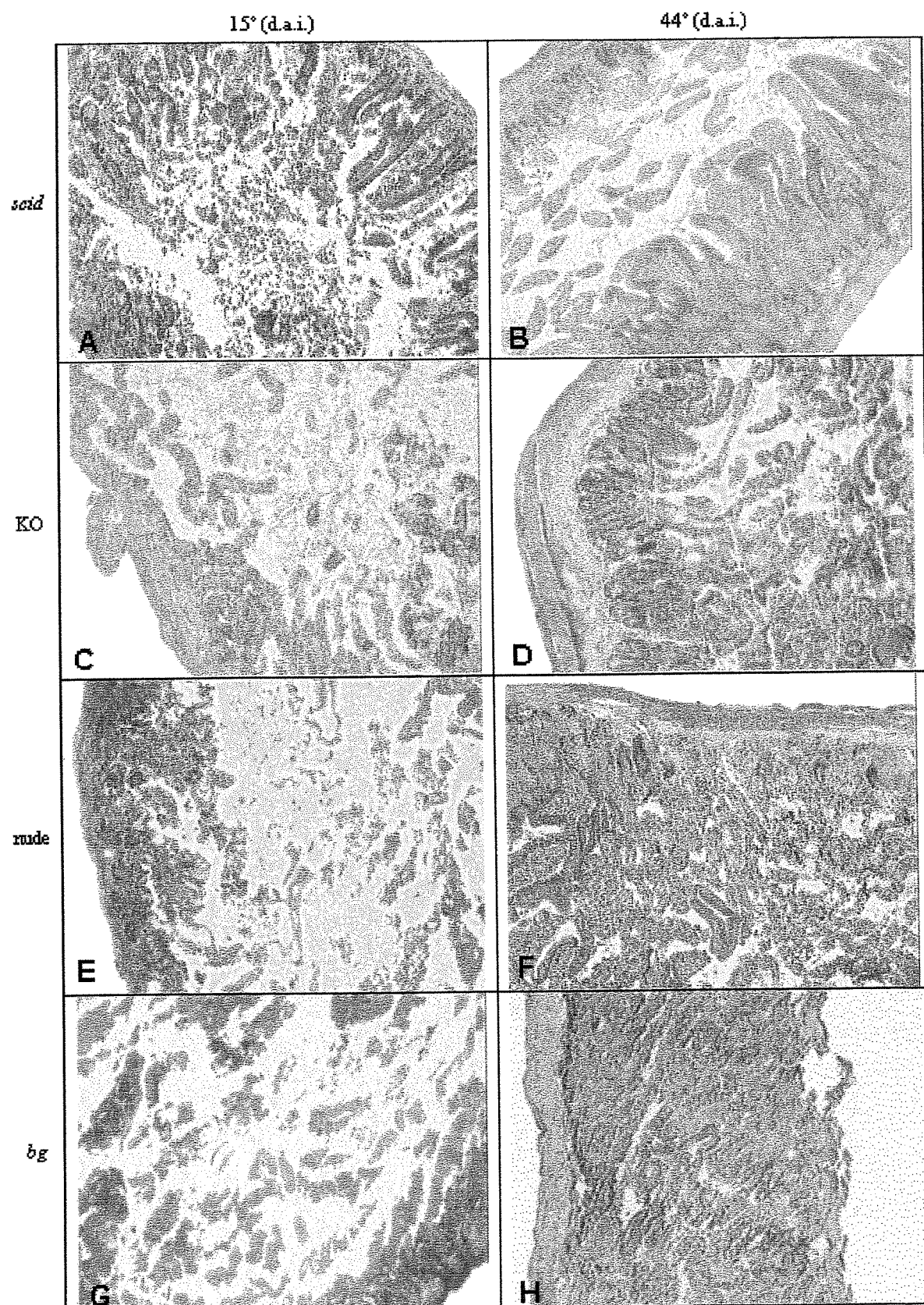
Prancha I

Prancha II - Microfotografia de jejuno de camundongos BALB/c/Uni e C57 BL/6/Uni. Aumento objetiva 10x.

BALB/c/Uni – jejuno – controle **(A)**, C57BL/6/Uni – jejuno – controle **(B)**, BALB/c/Uni – jejuno no 44º dia após a infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Com recuperação plena **(C)**, C57BL/6/Uni jejuno no 44º dia após a infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Com recuperação **(D)**.

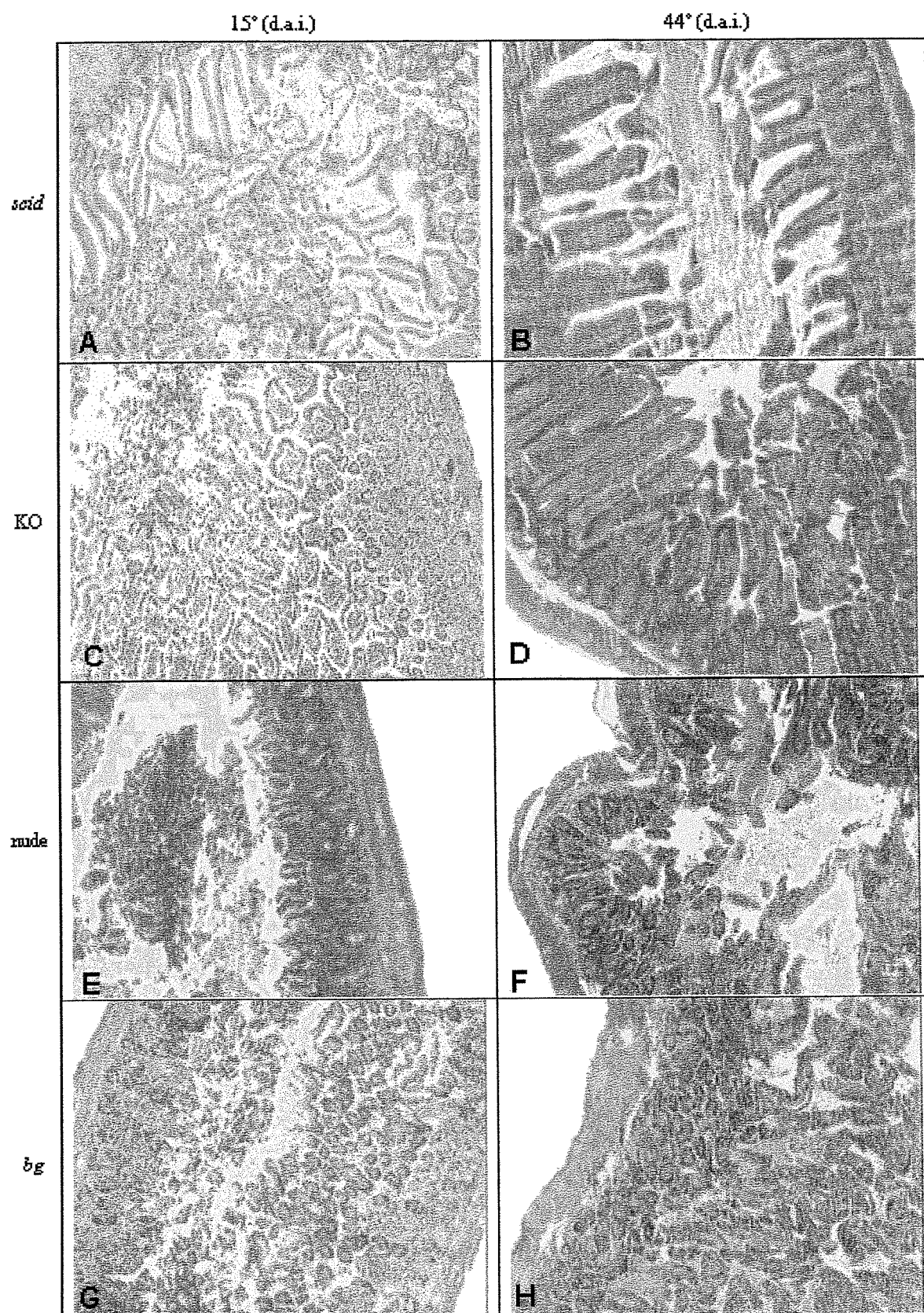


Prancha III - Microfotografia de jejuno de camundongos C.B-17 scid, C57BL/6 KO para INF- γ , C3H nu e C57BL/6 bg no 15° e 44° dia após infecção (d.a.i.) com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Aumento objetiva 10x. Scid – 15° (d.a.i.) infecção aguda (**A**), Scid - 44° (d.a.i.) recuperação (**B**), KO - 15° (d.a.i.) infecção aguda precoce quadro de erosão profundo com destruição das vilosidades (**C**), KO - 44° (d.a.i.) em regeneração, há traços de recuperação (**D**), nude - 15° (d.a.i.) infecção aguda precoce com erosão acentuada (**E**), nude - 44° (d.a.i.) há demonstração de recuperação com lise das porções apicais das vilosidades (**F**), bg - 15° (d.a.i.) infecção aguda precoce: destruição das vilosidades com extrusão das criptas (**G**), bg - 44° (d.a.i.) recuperação atrasada (**H**).



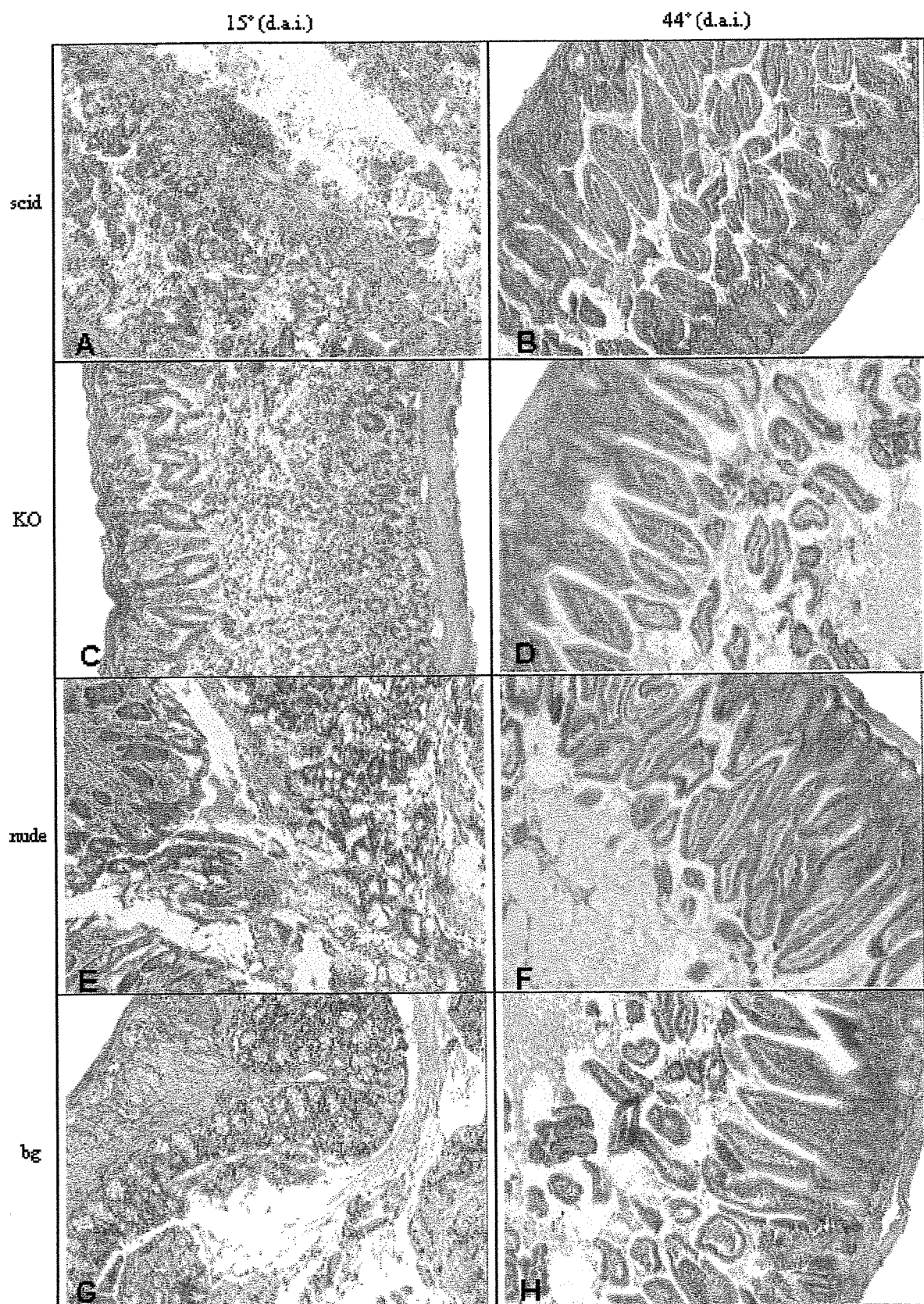
Prancha III

Prancha IV - Microfotografia de íleo de camundongos C.B-17 scid, C57BL/6 KO para INF- γ , C3H nu e C57BL/6 bg no 15° e 44° dia após infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Aumento objetiva 10x. Scid – 15° (d.a.i.) infecção aguda lise das vilosidades (A), scid – 44° recuperação das vilosidades (B), KO – 15° (d.a.i.) infecção aguda, lise parcial das vilosidades: conservação das criptas (C), KO – 44° (d.a.i.) infecção demonstrada pela escamação excessiva, há numerosas vilosidades integras, há traços de recuperação (D), nude – 15° (d.a.i.) infecção aguda lise parcial das vilosidades, conservação das criptas (E), nude – 44° (d.a.i.) recuperação parcial das vilosidades (F), bg – 15° (d.a.i.) infecção aguda, lise imediata das vilosidades (G), bg – 44° (d.a.i.) pouca recuperação da infecção (H).



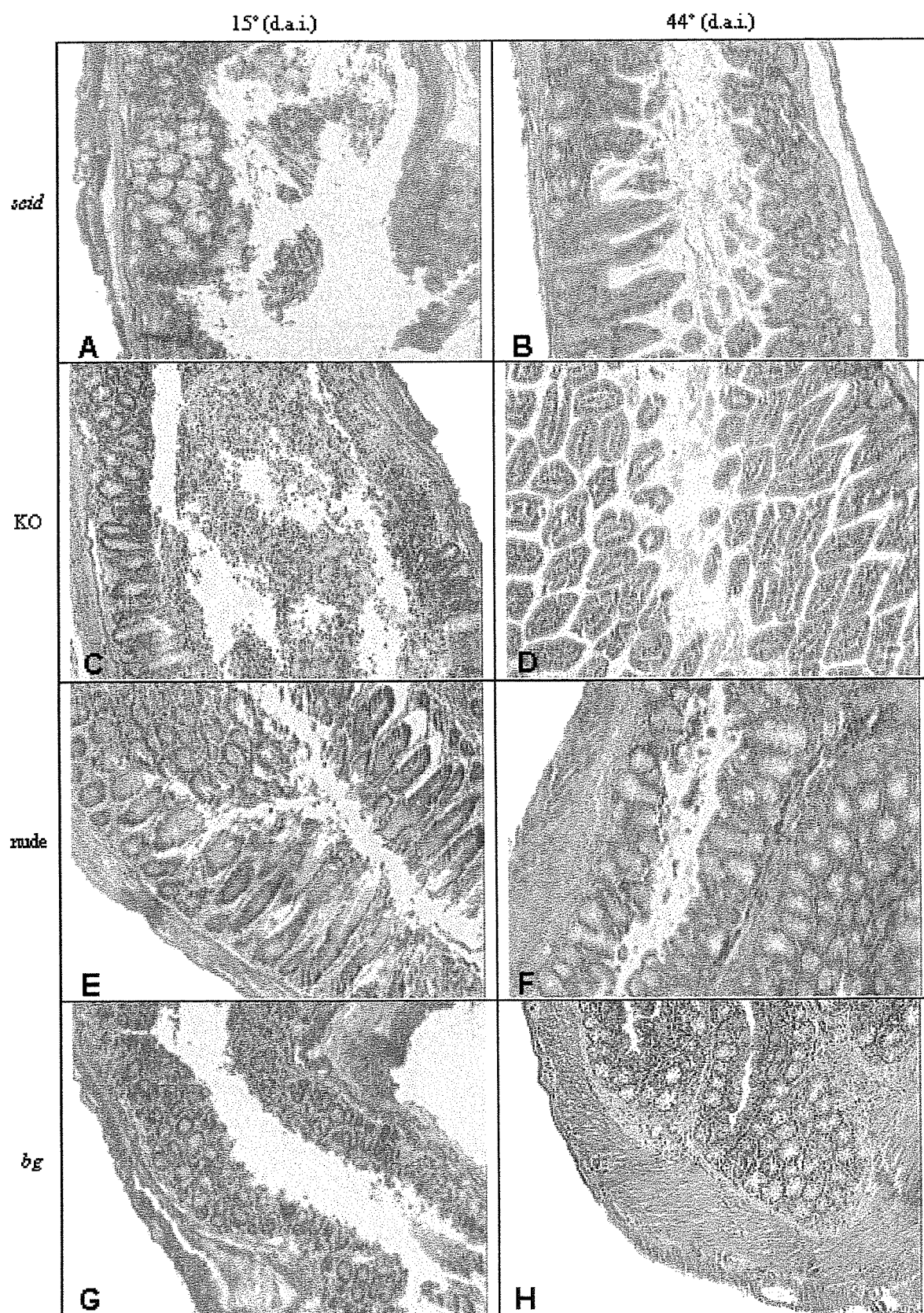
Prancha IV

Prancha V – Microfotografia de ceco de camundongos C.B-17 scid, C57BL/6 KO para INF- γ , C3H nu e C57BL/6 bg no 15° e 44° dia após infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Aumento objetiva 10x. Scid (A), KO (C), nude (E), bg (G) no 15° (d.a.i.) apresentam o mesmo quadro de infecção aguda. Scid – 44° (d.a.i.) demonstra quadro de recuperação (B), linhagens KO (D), nude (F), bg (H) no 44° (d.a.i.) demonstram quadro de recuperação parcial.

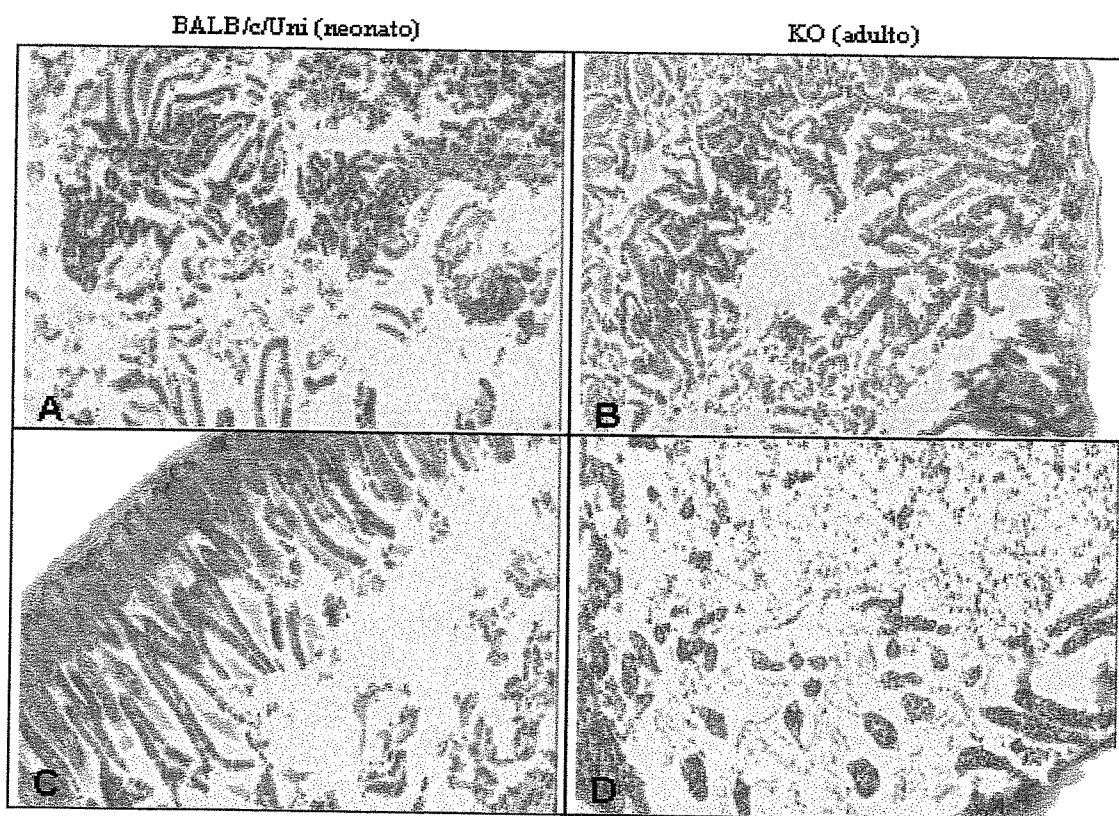


Prancha V

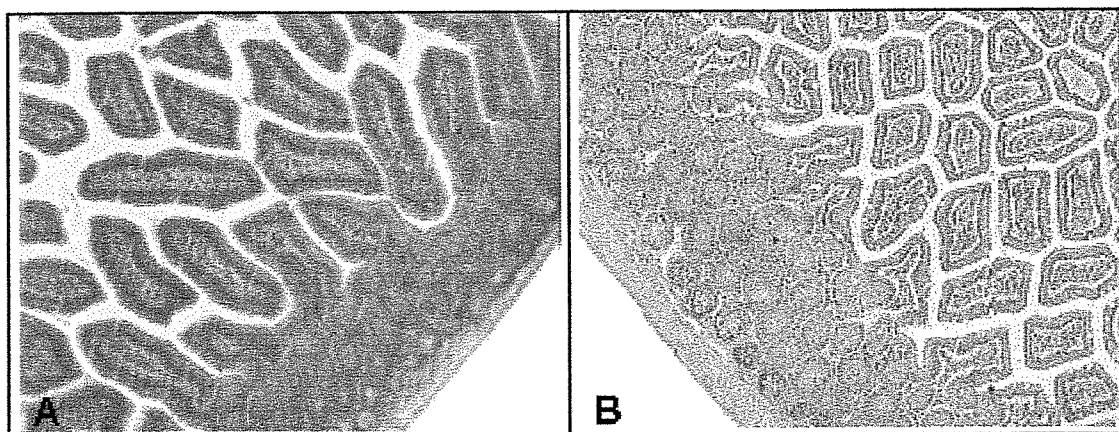
Prancha VI - Microfotografia de colon de camundongos C.B-17 scid, C57BL/6 KO para INF- γ , C3H nu e C57BL/6 bg no 15° e 44° dia após infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp. Aumento objetiva 10x. Scid – 15° (d.a.i.) infecção aguda (**A**), scid – 44° (d.a.i.) criptas integras com lise celular apical (**B**), KO -15° (d.a.i.) infecção aguda, erosão acentuada das criptas (**C**), KO – 44° (d.a.i.) recuperação parcial (**D**), nude – 15° (d.a.i.) erosão apical excessiva com descamação (**E**), nude – 44° (d.a.i.) recuperação parcial (**F**), bg – 15° (d.a.i.) infecção aguda com escamação mantém preservação das criptas (**G**), bg – 44° (d.a.i.) plena recuperação (**H**).



Prancha VI



Prancha VII – Microfotografia de jejuno de camundongos BALB/c/Uni e KO. Aumento objetiva 10x. Camundongos BALB/c/Uni infectados no 2º dia de vida com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp, e sacrificados no 7º dia após a infecção, com quadro de infecção aguda precoce (A, B). Camundongos KO, com 6 semanas de vida infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp, e sacrificados no 15º dia após a infecção, com destruição das vilosidades, quadro de erosão profunda, denotando infecção aguda precoce (C,D).



Prancha VIII – Microfotografia de jejuno (A) e colon (B) de camundongo C.B-17 *scid*. Aumento objetiva 10x. No 70º dia após a infecção com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp, evidenciando recuperação.

Quadro resumido das principais alterações histológicas no jejuno, íleo, e colon das linhagens KO, bg, nude e scid no 15° e 44° dia após infecção por 10⁵ oocistos de *cryptosporidium* sp

Linhagens	Tempo infecção (dias)	JEJUNO	ÍLEO	COLON
KO	15	Infecção precoce. Destruição das vilosidades. Quadro de erosão profunda, com extrusão das criptas.	Infecção aguda. Lise parcial das vilosidades. Conservação das criptas.	Infecção aguda. Erosão acentuada das criptas.
	44	Traços de recuperação da lesão das vilosidades.	Traços de recuperação.	Infecção aguda. Preservação das criptas.
bg	15	Infecção aguda precoce. Destruição das vilosidades com extrusão das criptas. Não tem vilosidades configuradas.	Infecção aguda. Lise imediata das vilosidades.	Infecção aguda. Preservação das criptas.
	44	Recuperação atrasada das vilosidades.	Traços de recuperação das vilosidades.	Recuperação total.
nude	15	Infecção aguda com erosão acentuada.	Infecção aguda. Lise parcial das vilosidades. Conservação das criptas.	Erosão apical excessiva com descamação.
	44	Recuperação parcial das vilosidades.	Recuperação parcial das vilosidades.	Recuperação parcial.
scid	15	Infecção aguda.	Infecção aguda. Lise parcial das vilosidades.	Infecção aguda. Alteração da arquitetura das criptas.
	44	Franca recuperação das vilosidades.	Recuperação total das vilosidades.	Criptas integras, mas com lise celular apical.

4. DISCUSSÃO

Em todas as linhagens de camundongos imunodeficientes foi possível observar que no 15º dia após a infecção, houve maior alteração histopatológica no intestino delgado. Conforme relatado por Greenberg & Cello, (1996) o protozoário coloniza o trato gastrointestinal principalmente no duodeno e íleo, e com menor frequência o colon e reto.

Os camundongos *scid* infectados com a linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp responderam à infecção com comprometimento maior do jejuno e colon, tanto no 15º como no 44º dias após a infecção, reproduzindo a infecção humana, observada em pacientes HIV positivos.

A criptosporidiose severa em paciente HIV positivos normalmente está associada à presença do *Cryptosporidium* no segmento proximal do intestino delgado e no colon. Na biópsia pode ser visualizado infiltrado inflamatório na lâmina própria e atrofia das vilosidades (CLAYTON et al, 1994).

A patogênese da criptosporidiose resulta em danos na superfície luminal e resposta imune da mucosa à infecção. Ocorre a infiltração da lâmina própria pelos linfócitos, macrófagos e neutrófilos, e também atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e formação de células epiteliais de escamação (MACDONALD, 2000).

Os experimentos conduzidos por Theodos et al, (1997) com camundongos KO para IFN- γ demonstraram que este modelo desenvolveu marcante destruição da mucosa intestinal, eliminou grande quantidade de oocistos, apresentou perda de peso e morte no 10º dia após a infecção. Resultados similares foram observados em nossos experimentos, com mortalidade dos camundongos KO para IFN- γ , no 11º dia após a infecção.

A dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp utilizando estas linhagens imunodeficientes revelou que a linhagem KO é a mais susceptível à infecção pelo *Cryptosporidium* sp (ALVES et al, 2004).

A produção de IFN- γ pelas células NK é importante na resistência à infecção pelo parasito. Em camundongos infectados com vírus, bactérias e parasitos, o pico de atividade das células NK é entre o 3º e 5º dias após a infecção, retornando ao nível basal no 7º dia (BANCROFT, 1993; SCOTT & TRINCHIERI, 1995).

O modelo *bg*, imunodeficiente para células NK, possivelmente não desencadeou a produção de IFN- γ , o que justifica a mortalidade precoce (ALVES et al, 2004), e a recuperação tardia na mucosa do intestino principalmente no íleo. A sobrevivência de camundongos *bg* pode estar associada à resposta Th2, que parece ser protetora, conforme resultados obtidos com camundongo B6 IL4^{-/-}, knockout para interleucina- 4 (AGUIRRE et al, 1998).

As alterações histológicas apresentadas pelo camundongo nude foram semelhantes ao KO para IFN- γ . A severidade das lesões pode estar relacionada com a ausência de subpopulações de linfócitos T na resposta Th1 e Th2.

Os resultados da linhagem *scid* e nude apresentam concordância com Taghi-Kilani et al, (1990) que avaliaram o papel do anticorpo na resposta ao *Cryptosporidium* sp, no modelo de camundongo BALB/c neonatal deficiente de célula B. Os autores sugeriram que a resposta humoral específica “in vivo” na resolução da infecção murina é sem importância. Entretanto outros autores adotando outro modelo de camundongo deficiente de célula B (TCR alpha^{-/-}) demonstraram que o linfócito B é necessário para a indução das lesões inflamatórias do intestino (WALTERS et al, 2000).

A infecção de camundongos imunodeficientes com a linhagem MMC evidenciou que são necessárias células T, NK e IFN- γ para a resistência à infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M. & SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p.787-793, 1996.
- ARGENZIO, R.A., LECCE, J. & POWELL, D.W. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v.2, p.440-447, 1993.
- AGUIRRE, S.A.; PERRYMAN, L.E.; DAVIS, W.C., & MCGUIRE, T.C. IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: analysis of CD4+alpha beta+IFN-gamma+ and CD4+alpha beta+IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. **Journal of Immunology**, v.161, p.1891-1900, 1998.
- ALVES, D.P.; BRITTO, M.H.S.S & GUARALDO, A.M.A. Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes. Artigo submetido a publicação na Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento em 15.06.2004 (no prelo).
- BANCROFT, G.J. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Current Opinion in Immunology**, v.5, p.503-510, 1993.
- BIRD, R.G. & SMITH, M.D. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. **Journal of Pathology**, v.132, p.217-233, 1980.
- BRITTO, M.H.S; ALVES, D.P.; FREITAS, F.F.T. & GUARALDO, A.M.A. Isolamento de *Cryptosporidium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado humano em camundongos. Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório VII, 03 a 06/12/2000, Campinas.
- CAREY, C.M.; LEE, H. & TREVORS, J.T. Biology persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v.38, p.818-62, 2004.
- CLAYTON, F.; HELLER, T.& KOTLER, D.P. Variation in the enteric distribution of cryptosporidia in acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Clinical Pathology**, v.102, p.420-425, 1994.

- EICHELBERGER, M.C.; SURESH, P. & REHG, J.E. Protection from *Cryptosporidium parvum* infection by gammadelta T cells in mice that lack alphabeta T cells. **Comparative Medicine**, v.50, p.270-276, 2000.
- FAYER, R., SPEER, C. & DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*, p.1-41. IN: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Fayer, R. (ed), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1997.
- GAGINELLA, T.S.; KACHUR, J.F. ;TAMAI, H. & KESHAVARZIAN, A. Reactive oxygen and nitrogen metabolites as mediators of secretory diarrhea. **Gastroenterology**. v.109, p.2019-2028, 1995.
- GILIOLI, R.; SAKURADA, J.K.; ANDRADE, L. A.G.; KRAFT, V.; MEYER, B.& RANGEL, H.,A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian Animal facilities. **Laboratory Animal Science**, v.46, p.582-84, 1996.
- GILIOLI, R., ANDRADE, L. A. G., PASSOS, L. A. C., SILVA, F. A., RODRIGUES, D.M., GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.33-37, 2000.
- GREENBERG, P.D. & CELLO, J.P. Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.4, p.348-354, 1996.
- McDONALD, V. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. **Parasite Immunology**, v.12 p.597-604, 2000.
- OKHUYSEN, P.C. & CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet? **International Journal for Parasitology**, v.32 p.517-25, 2002.
- PASSOS, L.A.C. & ALVES, D.P. Isoladores. IN: Manual para Técnicos em Bioterismo. De Luca, RR., Alexandre, SR., Marques, T., Souza, NL., Merusse, JLB. e Neves, S. P. (eds) 2ª ed. São Paulo, p.27-34, 1996.

PEETERS, J. & VILLACORTA, I. *Cryptosporidium*. IN: EUR 16602 – Guidelines on Techniques in coccidiosis research. J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert Ed. Luxembourg. p. 202-240, 1995.

SCOTT P, TRINCHIERI G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current Opinion in Immunology**, v.1, p.34-40, 1995.

TAGHI-KILANI R, SEKLA L, HAYGLASS KT. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection. Studies with B cell-depleted mice. *Journal of Immunology*, v.145, p.1571-1576, 1990.

THEODOS, C.M., SULLIVAN, K.L., GRIFFITHS, J.K., 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. **Infection and Immunity**, v.11, p.4761-4769, 1997.

WATERS, W.R., PALMER, M.V., WANNEMUEHLER, M.J., SACCO, R.E. & HARP, J.A. B cells are required for the induction of intestinal inflammatory lesions in TCRalpha-deficient mice persistently infected with *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Parasitology**, v.5, p.1073-1077, 2000.

5. CONCLUSÕES

A observação da evolução da criptosporidiose em linhagens de camundongos imunodeficientes permitiu as seguintes conclusões:

- 1- Foi possível estabelecer a manutenção “in vivo” da linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongos neonatos de linhagem imunocompetente, e também em camundongos adultos C57BL/6 KO para IFN- γ . Os camundongos KO demonstraram ser o melhor modelo para o estudo da infecção pelo *Cryptosporidium* sp.
- 2- Ficou constatado que durante a manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp, não houve perda da infectividade do *Cryptosporidium* sp.
- 3- O perfil das linhagens de camundongos estudadas, quanto a mortalidade e maior liberação de oocistos indicou o seguinte padrão:
KO > nude > *bg* > *scid* > BALB/c > C57BL/6.
- 4- IFN- γ e os linfócitos T são importantes no controle da criptosporidiose, principalmente na fase aguda da infecção.
- 5- Os resultados das linhagens nude e *scid* sugerem que a resposta humoral tem pequena participação no controle da criptosporidiose.
- 6- Existe correlação entre a quantidade de oocistos *Cryptosporidium* sp liberados e a patologia intestinal nas linhagens imunodeficientes.

7- Na fase aguda da criptosporidiose, todas as linhagens de camundongos imunodeficientes apresentaram quadro de infecção aguda com alterações histológicas no jejuno e íleo tais como: lise parcial e imediata até destruição das vilosidades e extrusão das criptas. As linhagens de camundongos que apresentaram maior comprometimento histopatológico foram KO, *bg* e nude.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V.J.S., 2001. Avaliação da Eficácia do Colostro Bovino Hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*. Tese de Doutorado, Usp, p.111, 2001.
- ALAK, J.I, WOLF BW, MDURVWA EG, PIMENTEL-SMITH GE, KOLAVALA S, ABDELRAHMAN J & SUPPIRAMANIAM V. Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunodeficient C57BL/6 mice. **Cellular and Molecular Biology**, v.45, p.855-863, 1999.
- AMIRI P, LOCKSLEY RM, PARSLOW TG, SADICK M, RECTOR E, RITTER D & MCKERROW JH. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**. v. 16, p.604-607, 1992.
- ARROWOOD, M. J., MEAD, J. R., MAHRT, J. L., & STERLING, C. R. Effects of immune colostrum and orally administered antiparasite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. **Infection and Immunity**, v.57, p.2283-88, 1989.
- AKIYOSHI, D.E., FENG, X., BUCKHOLT, M. A WIDMER G. TZIPORI S. Genetic Analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through Different Host Species. **Infection and Immunity**, v.10, p.5670-5675, 2002.
- BLANSHARD, C., JACKSON, A M., SHANSON, D.C., FRANCIS, B.G. & GAZZARD. Cryptosporidiosis in HIV seropositive patients. **Quarterly Journal Medicine**, v.85, p.813-23, 1992..
- BOSMA, G.C., CUSTER, R., & BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**. v 301, p.527-530, 1983.
- BOSMA, G. C. FRIED, M. CUSTER, R., CARROLL, A. GIBSON, D. M. & BOSMA, M. J. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p.1016-1033, 1988.

- BOSMA, G.C., DAVISON, M. T., RUTTSCH, N.R., SWEET, H.A, SCHULTZ, L. D. BOSMA, & M. J. BOSMA. The mouse severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. **Immunogenetics** v.29, p.54-57, 1989.
- BRITTO,M.H.S, ALVES, D.P. FREITAS, F.F.T. & GUARALDO, A. M.A. Isolamento de *Cryptosporidium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado humano em camundongos. VII Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório em Campinas – S.P. (03 a 06/12/2000).
- CAREY, C.M., LEE, H. & TREVORS, J.T. Biology persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v.38, p.818-62, 2004.
- CARROLL, A. M., BOSMA & M. J. Detection and characterization of functional T cells in mice with severe combined immune deficiency. **European Journal Immunology**, v.18, p.1965-1971, 1988.
- CAROLL, A. M., HARDY, R. R. BOSMA & M. J. Occurence of Mature B (IgM+ B220+) and T (CD3+) lymphocytes in scid mice. **Journal Of Immunology**, v.143, p.1087-1093, 1989.
- CHAMPBELL L. D., STEWART, J. N. & MEAD, J. R. Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine and chemokine-receptor knockout mice. **Jornal of Parasitology**, v.88, p.1014-16, 2002.
- Center for Disease Control and Prevention <http://www.cdc.gov> consulta abril/2004
- CHAPPELL CL, OKHUYSEN PC, STERLING CR & DUPONT HL. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. **The Journal of Infectious Diseases** , v.1, p.232-236, 1996.
- CRAWFORD, F. G. & S. H. VERMUD. Human Cryptosporidiosis . **Critical Reviews Microbiology**. v.16 p.113-159. 1988
- DAVIS, C. P., MCALLISTER, J. S. & SAVAGE, D.C. Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. **Infection and Immunity**, v.7 p.666-672, 1973.

- ELIN, R.J., EDELIN, J.B. & WOLFF, S.M. Infection and immunoglobulin concentrations in Chediak-Higashi mice. **Infection and Immunity**, v 10, p.88-91, 1974.
- ENRIQUEZ, F. J., & STERLING, C. R. *Cryptosporidium* Infections in Inbred Strains of Mice. **Journal Protozoology**, v.38, p.100-02, 1991
- FAYER, R., SPEER, C. & DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*, p.1-41. IN: R. Fayer (ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1997.
- FLANAGAN, S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genetic Research**, v.8 P.295-309. 1966.
- FRANCO, R.M. & CORDEIRO, N. S. Giardiasis and cryptosporidiosis in day-care centers in the municipality Campinas SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.6, p.585-591, 1996.
- FRANCO, R.B., ROCHA-EBERHARDT, R. & CANTUSIO NETO, R. Ocurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, p.109-111. 2001.
- GILLES, H.M. & HOFFMAN, P.S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. **Trends in Parasitology**, v.18, p.95-97, 2002.
- GILIOI, R., SAKURADA, J.K., ANDRADE, L. A.G., KRAFT, V., MEYER, B., RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Laboratory Animal Science**, v.46, p.582-84, 1996.
- GILIOI, R., ANDRADE, L. A. G., PASSOS, L. A. C., SILVA, F. A., RODRIGUES, D.M. & GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.33-37, 2000.
- GORDON, B. E., DURFEE, W. J., BENNETT, M. & PAKES, S.P. Differential white blood cell counts as a preliminary screen for severe combined immunodeficient congenic mice. **Laboratory Animal Science**, v.41, p.255-257, 1991.

- GOSTIN, L.O, LAZZARINI, Z., NESLUND, V.S., & OSTERHOLM, M.T. Waterquality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. **American Journal of Public Health** v6 p.847-853, 2000.
- GOTTSTEIN, B., NASH, T.E. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: infection of congenitally athymic nude and scid mice. **Parasite Immunology**, v.13 p.649-659, 1991.
- GUARINO, A., CANANI, R.B., CASOLA, A., POZIO, E., RUSSO, R. BRUZZESE, E., FONTAN, M. & RUBINO, A Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v.4, p.976-983, 1995.
- GREENBERG, P. & CELLO, J. Treatment of severe diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.13, p. 348-354, 1996
- GRIFFTHS, J .K. Human Cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treament and diagnosis. **Advances in Parasitology**, v.40, p.37-85, 1998.
- GRIFFTHS, J. K., THEODOS, C., PARIS, M., & TZIPORI, S. The gamma interferon gene Knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parum*. **Journal f Clinical Microbiology**. v.36, p. 2503-2508, 1998.
- HARP, J. A., WANNEMUEHLER, M. W., WOODMANSEE, D .B. & MOON, H. W. Susceptibility of germ-free or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. **Infection and Immunity**, v.56, p.2006-2010, 1988.
- HARP JA, JARDON P, ATWILL ER, ZYLSTRA M, CHECEL S, GOFF JP, DE SIMONE C. Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. **American Journal of Veterinary Research**, v57 p. 1586-8. 1996.
- HEINE, J F., MOON, H. W. & WOODMANSEE, D.B. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. **Infection and Immunity**, v. 43, p.856-59, 1984.

- HENRIKSEN, S.A., POHLENZ, J.F.L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinary Scanddinavian**, v.22, p.594-596, 1981.
- JOHNSON LL. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. **Infection and Immunity**, v.60, p.3719-3724, 1992.
- KIRKPATRICK, C.E., & FARRELL, J.P. Leishmaniasis in beige mice. **Infection Immunity**, v.38, p.1208-1216, 1982.
- LANE, P.W. & MURPHY, E.D. 1972. Susceptibility to spontaneous pneuminitis in an inbred strain of beige and satin mice. **Genetics** 72:451-460.
- LEVINE, N.D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. vol. I e II. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida 1998.
- LUTZNER, M.A. LOWRIE, C.T. & JORDAN, H.W. Gigant granules in leukocytes of the beige mouse. **Journal Hereditary**. v58 p. 299-300, 1967
- MacDonald, V.; DEER, R.; UNI, S.; ISEKI, M. & BANCROFT, G. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent ou immunocompromised (nude and SCID) mice. **Infection Immunity**, v.60, p.3325-31, 1992.
- MACKENZIE, W.R., N.J. HOXIE, M.E. PROCTOR, M.S. GRADUS, K.A. BLAIR, D.E. PETERSON, J.J. KAZMIERCZAK, D.G. ADDISS, K.R. FOX, J. B. ROSE, ET AL. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.
- MEAD, J.R. & YOU, X. Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. **Journal of Parasitology**, v. 84, p.1045-48, 1998.
- MEAD, J. R., ARROWOOD, M. J., SIDWELL, R.W.& HEALEY, M. C. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. **Journal of Infectious Disease**, v.163, p.1297-1304, 1991.

- MEISEL, J.L. PERERA, D. R., MELIGRO C. & RUBIN, C. E. Zoverwhelming watery diarrhoea associated with a *Cryptosporidium* in na immnosuppresed patient. **Gastroenterology**, v.70, p.1156-1160, 1976.
- MILLARD, P.S., GENSHEIMER, K.F., ADDISS, D.G., SOSIN, D.M., BECKETT, G.A, HOUCK JANKOSKI, A & HUDSON, A . An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **JAMA**, v.20, p.1592-1596, 1994.
- MORGAN UM, CONSTANTINE CC, O'DONOGHUE P, MELONI BP, O'BRIEN PA, THOMPSON RC. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.52, p. 559-54-564, 1995.
- MORGAN-RYAN UM, FALL A, WARD L. A. HIJAWI, N., SULAIMAN, I, FAYER, R., THOMPSON, R. C., OLSON, M, LAL, A, XIAO L., *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens* **Journal Eukaryot Microbiology**, 49 p. 433-440, 2002.
- NELSON RG, KIM K, GOOZE L, PETERSEN C & GUT J. Identification and isolation of *Cryptosporidium parvum* genes encoding microtubule and microfilament proteins. **Journal Protozoology**, 38p. 52S-55S, 1991.
- NIME, F., A, BUREK, J. D., PAGE, D. L. *et al.* Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium* **Gastroenterology**, v.70, p.592-98, 1976.
- OKHUYSEN, P.C, & CHAPPELL, C.L. *Cryptosporidium* virulence determinants are we there yet? **International Journal for Parasitology**, v.32 p. 517-525, 2002.
- PANTELOURIS, E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. **Nature**. v.217, p. 370-371, 1968.
- PASSOS, L. A. C. & ALVES, D.P. Isoladores. IN: Manual para Técnicos em Bioterismo. De Luca, R.R., Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merusse, J.L.B. e Neves, S. P. (eds) Segunda ed. São Paulo. 27-34, 1996

- PEETERS, J. & VILLACORTA, I. *Cryptosporidium*. IN: EUR 16602 – Guidelines on Techniques in coccidiosis research. J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert Ed. Luxembourg. p. 202-240, 1995.
- PEDERSEN, C., DANNER, S., LAZZARIN, A. GLAUSER, M.P., WEBER, R. KATLAMA, C., BARTON, S.E. & LUNDGREN, J. D. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. **Genitourinary Medicine**, v.2, p.128-131, 1996.
- PEREIRA, S.J., RAMIREZ, N.E., XIAO, L., & WARD, L.A. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. **Journal of Infectious Disease** v.5, p.715-718, 2002.
- PICKERD N & TUTHILL D. Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment. **Postgraduated Medicine Journal** v 80, p. 112-113, 2004.
- REHG, J. E., HANCOCK, M. L. & WOODMANSEE, D. B. Characterization of a dexamethasone-treated rat model of cryposporidial infection. **Journal of Infectious Disease**, v.158, p.1406-1407, 1988.
- 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. **Journal Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, p. 275-282, 2002.
- RODER, J.C. The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function. **Journal of Immunology**, v 123, p. 2168-2173, 1979.
- SASAHARA, T., MARUYAMA, H., AOKI, M., KIKUNO, R., SEKIGUCHI, T., TAKAHASHI, A., SATOH, Y., KITASATO, H., TAKAYAMA, Y. & INOUE, M. Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. **Journal of Infection Chemotherapy**, v.3, p.278-281, 2003.
- SAVAGE, D. C., DUBOS, R., & SCHEDLER, R. W. The gastrointestinal epithelium and it autochtonous bacterial flora. **Journal Experimental Medicine**, v.127, p.67-75, 1968.

- SODRÉ, F.C. & FRANCO, R.M.B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira Análise Clínica**, vol.33(2), p.97-107, 2001.
- SKELLAM, G.R., ALLAN, J.E., PAPADIMITRIOU, J.M. & BANCROFT, G.J. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. **Proceedings National Academic Science**, v 78, p. 5104-5108, 1981.
- SMITH, H. V. & ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.
- STANTIC-PAVLINIC, M., XIAO, L., GLABERMAN, S., LAL AA, OREZEN T., RATAJ-VERGLEZ A, LOGAR, J., BERCE, I. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. **Wien Klin Wochenschr** . v. 28, p. 115 p. 125-127, 2003.
- STEINER TS, THIELMAN NM, GUERRANT RL. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? **Annual Review Medicine**, v.48, p. 329-340, 1997.
- TAGHI-KILANI, R., L.S. , & k.T.HAYGLASS. The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. Infection: studies with B cell-depleted mice. **Journal of Immunology** v.145, p.1571-1576, 1990.
- THEODOS CM, GRIFFITHS JK, D'ONFRO J, FAIRFIELD A, TZIPORI S. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. **Journal Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, p1959-1965, 1998.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceeding Society Experimental Biology Medicine**, v.5, p.12-13, 1907.
- TYZZER,E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archivs Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.
- TZIPORI S, ROBERTON D, CHAPMAN C. Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **Brazilian Medical Journal** . v15, p. 1276-1277, 1986.

- TZIPORI , S. & GRIFFITHS, J. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum* . IN: Advances in Parasitology – Opportunistic Protozoa in Humans. Baker, J.R., Mullrt, R., Rollinson, D. & Tzipori, S. eds. Academic Press Ltd. London, v.40, p.6-36, 1998.
- UNGAR, B.L. P., J.A. BURRIS, C.A. QUINN, & F. D. FINKELMAN. New mouse models or chornic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infection Immunity** , v.58, p.961-69, 1990.
- VARKILA K., CHATELAIN R, LEAL, LM, COFFMAN RL. Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 262-268, 1993.
- WIDMER, G., LIN, L., KAPUR, V., FENG, X. & ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infections** v4, p. 1081-1090, 2002.
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U. & UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

7. ANEXOS

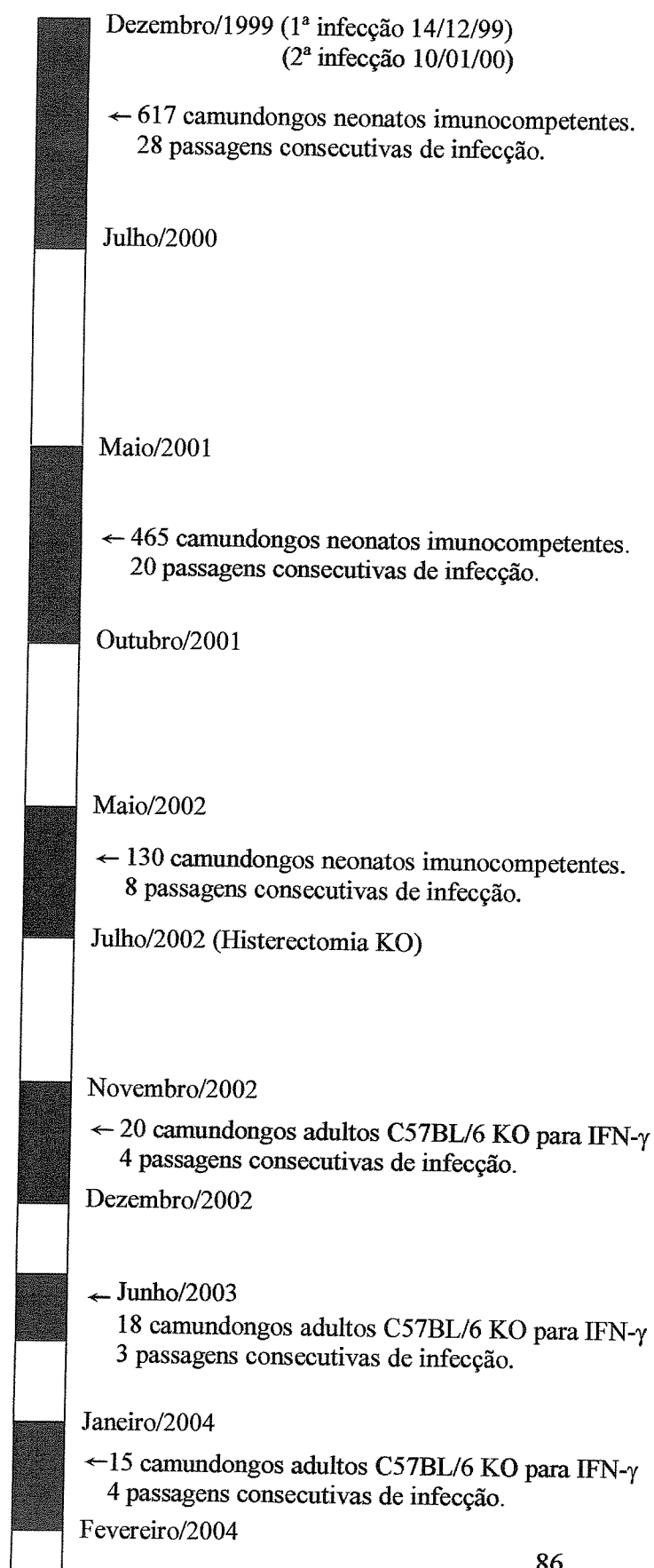
Anexo I: - Manutenção do Cultivo “in vivo” do *Cryptosporidium* sp.

Anexo II: Alves, D. P., Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A & Zanfolin, M. Capítulo 25 Gnotobiologia **IN:** Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.211- 224, 2002.

Anexo III: Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A., Alves, D. P., Pire, L. A., Santana, T. M., Dini, T. H. C. Capítulo 26 Criopreservação de Embriões Murinos em Biotérios **IN:** Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.225- 245, 2002.

Anexo IV: Protocolo Experimental 428-1- CEEA- Comissão de Ética em Experimentação Animal

Anexo I - Manutenção do Cultivo “in vivo” do *Cryptosporidium* sp.



Legenda

□ Período sem infecção
Oocistos de *Cryptosporidium* sp.
mantidos em dicromato de potássio a
2,5% a 4°C.

■ Período - Manutenção do Cultivo “in vivo” do *Cryptosporidium*.

Total de animais utilizados para a
Manutenção do *Cryptosporidium* sp. no
período de Dezembro/1999 à
Fevereiro/2004 = 1265.
67 passagens consecutivas de infecção.

Anexo II: Alves, D. P., Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A & Zanfolin, M. Capítulo 25
Gnotobiologia IN: Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A.,
Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.211- 224, 2002.



Animais de Laboratório

criação e experimentação

Antenor Andrade
Sergio Correia Pinto
Rosilene Santos de Oliveira
Organizadores



Copyright © 2002 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / EDITORA

ISBN: 85-7341-015-6

Capa, projeto gráfico e edição eletrônica
Angélica Mello

Copidesque e revisão
Cristina Cristiane Lessa Dias
Jamaina Souza Silva

Supervisão editorial
Marcionílio Cavalcanti de Paiva

Catálogo-na-fonte
Centro de Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca Lincoln de Freitas Filho

-
- A598a Andrade, Antenor (org.)
Animais de Laboratório: criação e experimentação. / Organizado por Antenor Andrade, Sérgio Correia
Pinto e Rosilene Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.
388p., il., tab., graf.
- I. Animais de laboratório 2. Manuais de Laboratório [tipo de publicação] I. Pinto, Sérgio Correia (org.)
II. Oliveira, Rosilene Santos de (org.).

CDD - 20.ed. - 619

2002
Editora Fiocruz
Av. Brasil, 4036 - 1º andar - sala 112 - Manguinhos
21040-361 - Rio de Janeiro - RJ.
Tels.: (21) 3882-9039 e 3882-9041
Telefax: (21) 3882-9007
e-mail: editora@fiocruz.br
http://www.fiocruz.br



Gnotobiologia

Delma Pegolo Alves

Luiz Augusto Corrêa Passos

Ana Maria Aparecida Guavaldo

Marcos Zaufolín

INTRODUÇÃO

A evolução do conhecimento na área biomédica exigiu que os ensaios passassem a ser realizados de forma totalmente controlada. Para tanto, foi necessário o aprofundamento das atividades de várias áreas como aquelas relacionadas às drogas, reagentes e equipamentos, entre outros. Entre essas áreas, destaca-se a ciência em animais de laboratório, que passa a apresentar dois objetivos principais: a produção de animais já estabelecidos para a pesquisa biomédica e o desenvolvimento de novos modelos. Esses novos modelos seriam utilizados para responder a perguntas específicas, e por esta razão a sua constituição genética, o seu *status* sanitário e o ambiente no qual são produzidos passam a ser determinantes.

Nesse contexto, surgem os animais gnotobióticos. Palavra de origem grega, *gnotos* significa “bem conhecida” e *bios* “forma de vida associada”. Assim, o modelo gnotobiótico é constituído de um animal criado em ambiente controlado e portador de uma flora associada totalmente conhecida.

Os primeiros estudos na área da gnotobiologia foram iniciados com Luís Pasteur, que investigou a sobrevivência de organismos superiores na ausência de bactérias. Entretanto, obstáculos como a manutenção dos animais em um ambiente isento de germes dificultavam a realização desses testes. A solução surgiu com o desenvolvimento de equipamentos capazes de criar um ambiente que, embora artificial, permitisse o alojamento dos animais e o estudo das relações entre eles e a microbiota.

As diversas aplicações científicas desses animais serão discutidas no decorrer deste capítulo. Antes, porém, apresentamos, a seguir, uma pequena revisão histórica dos pontos de maior relevância dessa nova ciência.

- 1895 – Nuttall & Thierfelder conservam a vida de uma cobaia por 15 dias, na ausência de bactérias, porém sem crescimento.
- 1914 – Kuster mantém uma cabra por 1 mês com crescimento normal e sem contaminação bacteriana.
- 1930 – Reyners relata seus esforços para obter a primeira cobaia *germfree* em ambiente estéril.
- 1930-1933 – Reyners desenvolve projeto para o estudo da variação bacteriana em organismos superiores.
- 1934 – Reyners & Trexler introduzem a tecnologia para a manutenção de animais axênicos e para a construção de um novo modelo de isolador.
- 1936 – Uso de isoladores na histerectomia de macacos e cobaias e desenvolvimento de isoladores para galinhas.
- 1939 – Simpósio na Universidade de Notre Dame: *Micurgical and Germfree Methods*.
- 1943 – First Symposium on Gnotobiotic Technology e desmame do primeiro rato axênico.
- 1948 – Gustafsson: desenvolve isolador rígido em aço inox.
- 1951-1956 – Reyners mantém em uso, por cinco anos, um isolador em aço inox. Assim, foram produzidos 286 ratos e registradas 10 contaminações.

- 1956 – National Meeting of the Animal Care Panel. Reyners propõe o uso de colônias de animais Specific Pathogen Free (SPF) como modelo para pesquisa biomédica, em decorrência da qualidade do animal derivado das colônias de unidades isoladoras.
- 1957 – Trexler & Reynolds: desenvolvem o primeiro isolador flexível com baixo custo.
- 1959 – Second Symposium on Gnotobiotic Technology, abordando a importância dos animais SPF e da Flora Definida no desenvolvimento da ciência.
- 1960 – Utilização de animais *germfree* na rederivação de estoques de animais de empresas privadas e comercialização dos primeiros animais *germfree* para pesquisa.
- 1962 – Third Symposium on Gnotobiotic Technology. Do evento participaram 110 pesquisadores em apresentação de trabalhos, mesa-redonda e discussão sobre animais gnotobióticos. Nessa década, mais de 40 laboratórios já estavam utilizando isoladores flexíveis e 4 empresas privadas comercializavam roedores gnotobióticos.
- 1962 – Trexler: deixa o Albert Einstein College of Medicine para desenvolver isoladores hospitalares.
- 1966 – Trexler e o Staff da Royal Veterinary College desenvolvem isoladores para animais de grande porte.

A GNOTOBIOLOGIA NO BRASIL

No Brasil, em 1961, as pesquisas em gnotobiologia foram iniciadas pelo professor Dr. Enio Cardillo Vieira, na Universidade Federal de Minas Gerais, com projeto sobre crescimento e reprodução de caramujo *Biomphalaria glabrata* em condições axênicas, criados em tubos de ensaio. Posteriormente, os caramujos axênicos foram cultivados em isoladores de plástico flexível. Em 1979, o pesquisador importou uma colônia de camundongos axênicos da Universidade de Notre Dame (EUA) e, desde então, diversos trabalhos têm sido realizados utilizando esses animais.

CLASSIFICAÇÃO SANITÁRIA DOS ANIMAIS

A classificação dos animais de laboratório está relacionada ao tipo de biotério: aberto (animais sanitariamente não definidos) ou fechado (com uma complexidade variável do sistema de barreiras, capaz de manter colônias sanitariamente definidas).

AXÊNICO (*GERMFREE*): totalmente livres de flora microbiana associada, mantidos em unidade isoladora.

GNOTOBIÓTICO: com flora microbiana associada definida.

SPF: livres de patógenos específicos.

COBS: Caesarian Obtained Barrier System. São animais derivados de cesariana e mantidos sob sistema de barreiras.

VAF: Virus Antibody Free. São animais que não possuem anticorpos virais sorologicamente demonstráveis.

OBJETIVOS DA GNOTOBIOLOGIA

A gnotobiologia apresenta uma vasta aplicação, possibilitando a elaboração de ensaios experimentais multidisciplinares. Entretanto, alguns dos objetivos podem ser claramente evidenciados. Dentre eles destacamos:

- obtenção de matrizes livres de patógenos na derivação de novas colônias de animais em biotério para pesquisa biológica;

- elucidação das inter-relações entre o hospedeiro e sua flora microbiana associada;
- eliminação da interferência dessa flora no estudo de fenômenos biológicos.

COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS CONVENCIONAIS E *GERMFREE*

A utilização e a comparação entre animais convencionais e *germfree* mostram a influência e o papel da flora quanto às modificações qualitativas do conteúdo gástrico, à anatomia do tubo digestivo, à fisiologia digestiva e geral, à modificação do sistema imunitário do tubo digestivo, além do efeito barreira. Essas modificações envolvem o tubo digestivo e o trato intestinal, exposto à ação da microflora.

A seguir, destacaremos os efeitos importantes em nível de fisiologia geral e o efeito barreira.

FISIOLOGIA GERAL

Os animais *germfree* apresentam crescimento, peso e temperatura corporal iguais aos animais convencionais. No animal *germfree*, o coração é menor, e como consequência também o são o funcionamento cardíaco, o fluxo de sangue para a pele, fígado e intestino e o consumo de oxigênio.

Conforme descrito por Gorton (1965), os animais *germfree* apresentam paredes capilares e alveolares no pulmão menos espessas. A maturação sexual no *germfree* é mais lenta.

ALTERAÇÕES DO TUBO DIGESTIVO

Nos animais axênicos, o conteúdo cecal tem um pH maior, em virtude da ausência dos ácidos graxos voláteis produzidos pelo metabolismo fermentativo da microflora intestinal.

Não há diferença histológica estomacal entre o *germfree* e o convencional. A ausência de microflora não causa modificações de peso e da estrutura histológica do pâncreas. A morfologia do intestino delgado no rato e na cobaia axênicos difere pelo peso menor, mucosa mais lisa e uma população menor de células retículoendoteliais; a superfície da mucosa intestinal, no rato axênico, é 30% menor, sendo maior nas partes média e inferior do intestino delgado. As vilosidades são maiores na parte proximal e menores na parte distal do intestino delgado.

Estudos de micrografia eletrônica mostraram que as microvilosidades apresentam comprimento menor na presença da microflora. O decréscimo em relação ao axênico é de 5% no duodeno, 9% no jejuno e 18% no íleo.

No animal axênico, o trânsito intestinal é lento. Os animais axênicos ainda apresentam números reduzidos de placas de Peyer e de plasmócitos.

EFEITO BARREIRA

A flora bacteriana intestinal normal protege o hospedeiro contra a instalação de agentes patogênicos. Esse fenômeno de rejeição dos microorganismos exógenos é denominado efeito de eliminação ou de barreira.

DESCRIÇÃO DO ISOLADOR EQUIPAMENTO

APRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES BÁSICOS DO ISOLADOR

Para que haja eficiência no isolamento do animal durante o ensaio experimental, o equipamento deve apresentar as seguintes estruturas fundamentais.

ESTRUTURA PRINCIPAL, CORPO OU ENVELOPE – deve ser, do ponto de vista óptico, transparente para melhor visualização dos animais no interior do equipamento. Nos equipamentos flexíveis, utiliza-se uma grande variedade de material plástico como polietileno, polipropileno, poliuretano; no entanto, o *polyvinylchloride* (PVC) é o material mais comum para a confecção do equipamento. Os isoladores precisam ter PVC de espessura fina, resistência à ruptura e caráter atóxico. Devem também apresentar a vantagem de ajustar-se facilmente à pressão durante o manéjo.

Os isoladores rígidos são confeccionados em aço inox, PVC rígido, fibra de vidro, sendo assim fortes e resistentes. Apresentam inconveniente em relação à restrição aos movimentos do operador. Para determinadas espécies de animais (por exemplo, as aves), adota-se isoladores rígidos ou semi-rígidos.

PORTO DE PASSAGEM – é o local através do qual os materiais são introduzidos e retirados do isolador. O porto deve possuir diâmetro e localização, de acordo com as necessidades do ensaio experimental. As extremidades externa e interna do porto de passagem são revestidas por membranas plásticas denominadas capas, sendo removidas para a introdução ou retirada dos materiais. Esse tipo de porto de passagem é denominado de convencional.

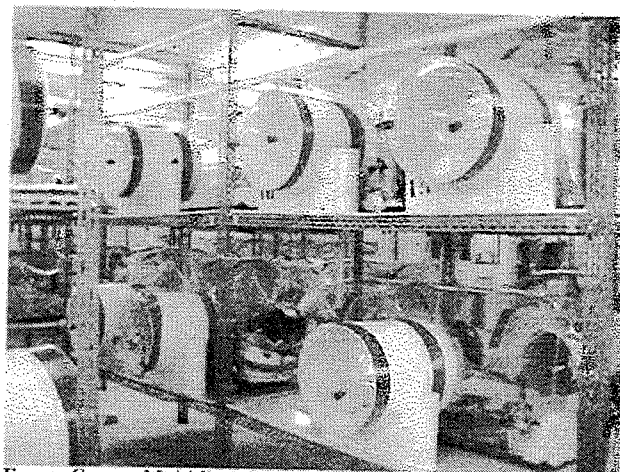
LUVAS DE MANUSEIO – as luvas podem ser de cano curto ou longo. O tipo de luva a ser adotado dependerá das atividades que serão desenvolvidas. Nos trabalhos que envolvem agentes químicos, as luvas devem ser avaliadas freqüentemente.

Com o decorrer do tempo, as luvas de borracha podem apresentar microfissuras que, apesar de imperceptíveis, oferecem risco potencial de contaminação. Nesse contexto, a adoção de luvas de cano curto se torna mais adequada por assegurar a sua reposição mesmo com o equipamento em uso.

FILTROS DE AR – a estrutura do filtro é cilíndrica, de forma a possibilitar maior superfície de contato com o ar e permitir a deposição do material filtrado. O elemento filtrante deve ser preferencialmente hidrófobo e apresentar atividade *high efficiency in pore activity* (HEPA), retendo assim 99,99% de partículas com o diâmetro superior a 0,3 μ m. O conjunto deve ser esterilizado no forno Pasteur a uma temperatura de 180 °C durante 120 minutos, ou autoclavados a 121 °C por 30 minutos.

MOTOR DE INSUFLAÇÃO – o ar é insuflado no equipamento por meio de um motor, permitindo um volume médio de 16 a 18 trocas de ar por hora. Alguns equipamentos podem oferecer motores para exaustão. São os isoladores de pressão negativa.

Figura 1 – Unidades isoladoras flexíveis



Fonte: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP).

Nos protocolos experimentais, onde há risco de contaminação para o pesquisador e para o meio ambiente em virtude da manipulação de agentes zoonóticos, adota-se isoladores com 'pressão negativa'. Nesse modelo de equipamento, caso ocorra um acidente, há entrada de ar externo, impedindo o comprometimento do meio ambiente.

Já nos casos nos quais os ensaios experimentais são realizados com animais livres de zoonoses, a escolha deve ser de isoladores com 'pressão positiva' (Fig. 1), pois no caso de um eventual acidente que comprometa o 'corpo principal' do equipamento, o ar sai, salvaguardando a integridade dos animais mantidos em seu interior.

Em ambos os modelos, a pressão final média é de 2 mm a 4 mm de coluna de água abaixo ou acima da pressão atmosférica normal.

ACESSÓRIOS BÁSICOS

A manutenção da rotina exige a utilização de alguns acessórios essenciais: o cilindro de esterilização e a luva de transferência.

CILINDRO DE ESTERILIZAÇÃO – acessório confeccionado em aço inoxidável com perfurações na porção mediana que serão cobertas por três camadas de elemento filtrante com atividade HEPA. Uma de suas extremidades é aberta, possibilitando o alojamento dos insumos básicos (ração, maravalha etc.). Após a colocação desses materiais, a extremidade é selada com uma membrana termorresistente e fixada com fita resistente a altas temperaturas. O cilindro é então introduzido na autoclave para ser esterilizado.

LUVA DE TRANSFERÊNCIA – permite a conexão entre o cilindro e o porto de passagem. A luva apresenta dois orifícios, nos quais são pulverizadas/vaporizadas as soluções germicidas utilizadas na esterilização.

ACESSÓRIOS ESPECIAIS

Tanto a manutenção de colônias de animais em centros de bioterismo como o desenvolvimento de alguns protocolos experimentais, algumas vezes, exigem acessórios especiais. Dentre esses, destacamos:

MANÔMETRO DIFERENCIAL – fornece indicações da pressão no interior do isolador quando em uso, indicando também o momento de troca dos filtros.

SISTEMA NO BREAK – é acionado quando ocorre interrupção de energia elétrica, mantendo o isolador inflado. É particularmente importante nas instituições que não têm sistema central de segurança (grupo gerador).

VÁLVULA NA SAÍDA DE AR – permite rápida compensação das oscilações na pressão oriundas do manuseio. É, portanto, um acessório que possibilita um controle rápido da pressão no interior do equipamento.

CONTROLADOR DE TEMPERATURA E UMIDADE – torna possível o registro das temperaturas mínimas e máximas no período. Quando a temperatura ultrapassa a faixa do bem-estar animal, o organismo sofre alterações, principalmente aumentando a frequência respiratória, cardíaca e elevando a temperatura.

PREPARO DE UNIDADES ISOLADORAS

A montagem dos isoladores, com seus respectivos acessórios, necessita de cuidados que possam assegurar a integridade do equipamento e a manutenção do *status* microbiológico das colônias.

Antes de efetuar a lavagem, desinfecção e esterilização, o isolador deve ser montado, inflado e avaliado quanto a sua integridade; para essa avaliação, pode ser usado o gás Freon 12.

Antes da ocupação do equipamento, recomenda-se a adoção dos seguintes procedimentos:

- Lavar todos os componentes do equipamento separadamente (corpo plástico ou envelope, luvas e punhos, chapéus interno e externo, tapetes, suportes e capas dos filtros, rolhas de borracha) com detergente para retirada de sujeira e gordura.
- Montar o equipamento e proceder a lavagem e desinfecção interna do corpo com detergente comum ou, preferencialmente, com solução detergente de amônia quaternária 0,5%.
- Enxaguar com água destilada/filtrada e enxugar. Aplicar álcool 70% com pulverizador.
- Introduzir os materiais que podem ser expostos a soluções químicas (tapete, gaiolas, pinças, rolhas de borracha, chapéu interno) e pulverizar toda a superfície interna e materiais com um poderoso germicida como o ácido peracético diluído 1:2.
- Deixar todos esses materiais expostos durante um período de 48 horas. Em seguida, romper o lacre dos filtros e proceder a ventilação até a completa retirada de resíduos do produto químico utilizado (por exemplo, o ácido peracético).
- Os filtros de ar montados com manta de lã de vidro em estruturas metálicas de aço inoxidável devem ser previamente esterilizados pelo calor seco a 180 °C durante 120 minutos. A autoclavagem a 121 °C por 30 minutos pode ser utilizada, porém, os filtros devem ser colocados em estufa para secagem após o processo. OBS.: em isoladores utilizados para manutenção de colônias axênicas e gnotobióticas, alguns procedimentos adicionais são indispensáveis. Indicamos, a seguir, alguns desses procedimentos.

1º – Durante a montagem do equipamento, deve-se assegurar que as superfícies de contato nas diferentes junções entre as partes estejam embebidas com a solução esterilizante. Os principais locais são:

- corpo principal e porto;
- corpo principal e chapéu externo;
- anéis e luva;
- anéis e punho;
- corpo principal e filtros de ar.

2º – Recomenda-se uma segunda esterilização após 48 horas de ventilação da primeira.

3º – Em consequência do desgaste natural dos componentes plásticos do equipamento, com surgimento de microfissuras e também a possibilidade de acidentes não percebidos, recomenda-se que a cada 3 a 6 meses novas colônias sejam formadas em outros equipamentos. Tal procedimento permite que as unidades em uso possam ser novamente avaliadas quanto a sua integridade estrutural.

Após a limpeza e desinfecção do equipamento, deve-se iniciar o preparo dos materiais que serão introduzidos no isolador e que servirão tanto na manutenção dos animais quanto para a avaliação sanitária do ambiente de seu interior. Para tanto, o cilindro de esterilização deverá ser montado com os seguintes itens:

- ração e maravalha: ambos colocados em sacos de algodão, de fácil manipulação e permeáveis ao vapor;
- toalhas para manter a limpeza da parede interna, possibilitando uma boa visão;
- frascos/tubos de ensaio para coleta de material para testes de esterilidade;
- swabs, meios de cultura para a realização dos testes;
- indicadores biológicos: tiras impregnadas com 10⁶ esporos de *Bacillus stearothermophilus* (microorganismo resistente a altas temperaturas);
- indicadores físico-químicos: fita com indicador de autoclave 3M e anidrido succínico em pó, que apresenta um ponto de fusão cuja temperatura é conhecida;
- gaiolas e tampas, frascos de bebedouros. Com exceção dos bebedouros, os outros materiais podem também ser introduzidos após desinfecção química no porto de passagem.

Após o preparo, o cilindro deve ser autoclavado a uma temperatura de 125 °C por um período de 30 minutos.

VALIDAÇÃO DO EQUIPAMENTO E MATERIAIS

A ocupação do isolador somente poderá ser feita após a certificação de que o equipamento está pronto, tanto do ponto de vista físico (integridade quanto a rupturas no corpo principal e vazamentos provenientes de falhas na montagem, entre outros) quanto do ponto de vista sanitário. Tais cuidados são mais necessários quando o objetivo é a manutenção de animais *germfree* e gnotobióticos.

Por essa razão, recomenda-se a coleta de amostras de *swabs* embebidos em meio de cultura de enriquecimento (BHI/TPB). A porção do equipamento a ser investigada é a superfície interna. Após o teste, o *swab* deverá ser semeado em caldo BHI, Tioglicolato e Sabouraud.

Paralelamente, deverão ser retiradas amostras da ração e maravalha que serão igualmente semeadas nos mesmos meios de cultivo (caldo BHI, Tioglicolato e Sabouraud).

As úrs contendo *Bacillus stearothermophilus*, introduzidas no preparo de materiais, também deverão ser retiradas e cultivadas a fim de se avaliar a eficiência do processo de esterilização.

Todas as amostras deverão ser incubadas à temperatura ambiente (25 °C), 37 °C e a 55 °C, de 5 a 7 dias.

A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS GNOTOBIÓTICAS NA CIÊNCIA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO, NA PESQUISA E NA INDÚSTRIA

CENTROS DE BIOTERISMO (ANIMAIS DE LABORATÓRIO)

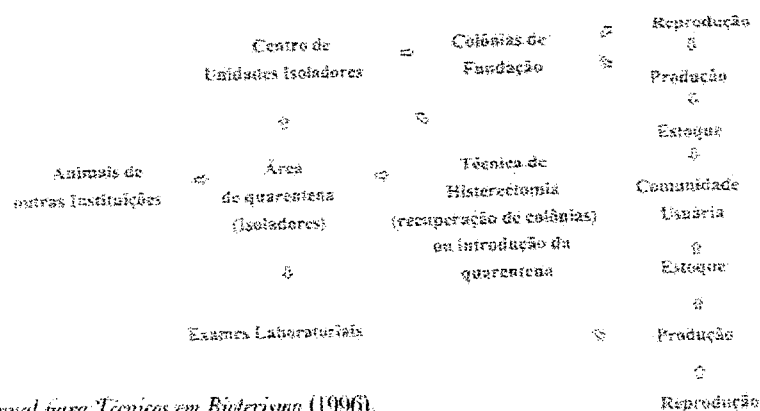
Conforme será observado em outros pontos, várias são as tecnologias originadas com o bioterismo e que são essenciais em centros dessa área.

Em centros de bioterismo, os isoladores são utilizados para realizar a preservação, manutenção de colônias de fundação de linhagens SPF, axênicas, gnotobióticas ou *germfree*, assegurando o padrão sanitário das colônias.

É indicado para a manutenção de animais provenientes de outras instituições em unidades isoladoras, visando ao estabelecimento de quarentena, até a certificação do padrão sanitário dos animais (Fig. 2).

Auxílio na técnica de derivação cesariana para obtenção de animais livres de contaminações (Sebesteny & Lee, 1973). A histerectomia é adotada como técnica simples para eliminar a maioria dos patógenos de animais que apresentam transmissão horizontal, sendo realizada, em condições totalmente assépticas, em unidades isoladoras construídas especialmente para essa finalidade.

Figura 2 – Apresentação esquemática do uso de unidades isoladoras em biotérios



Fonte: *Manual para Técnicas em Bioterismo* (1996).

USO DE TÉCNICAS GNOTOBIÓTICAS NA DERIVAÇÃO CESARIANA COMO FERRAMENTA PARA A DESCONTAMINAÇÃO DE COLÔNIAS

Em virtude da sua simplicidade, a derivação cesariana já há muito tempo é utilizada em centros de bioterismo dos países do primeiro mundo, bem como rotineiramente nas empresas produtoras de animais, como a Iffa Credo, Charles Rivers, Taconic, Olac, entre outras. Com essa técnica, é possível a eliminação da maioria dos patógenos de animais que apresentam transmissão horizontal, sendo, portanto, útil para obtenção de colônias SPF livres de vírus, bactérias e parasitas.

A técnica deve ser realizada em condições assépticas dentro de unidades isoladoras especialmente construídas para essa finalidade.

Uma maior eficiência é observada desde que a sua realização aconteça dentro das condições abaixo indicadas:

- acasalamento programado das fêmeas receptoras SPF e doadoras convencionais, mediante sincronismo do ciclo estral;
- preparo do isolador de histerectomia especialmente construído para essa finalidade;
- conexão entre o isolador de histerectomia e isolador com fêmea receptora;
- sacrifício da fêmea doadora por deslocamento cervical;
- preparo do abdômen para retirada do útero;
- isolamento do cervix e dos cornos uterinos por amarração e retirada asséptica do útero (nos casos em que a técnica esteja sendo realizada em equipamento apropriado, essa retirada deve ser feita no primeiro compartimento do isolador de histerectomia);
- passagem do útero para o segundo compartimento do isolador de histerectomia através de um tanque de imersão com solução anti-séptica (amônia quaternária a 0,5% °C a 37 °C);
- retirada e reanimação dos neonatos;
- transferência dos neonatos reanimados para o isolador com a fêmea receptora.

OBS.: a derivação cesariana deve ter início 12 horas antes do parto normal.

POR QUE UTILIZAMOS A DERIVAÇÃO CESARIANA?

Infelizmente, o caráter epidemiológico em colônias fechadas (*closed colony*) é extremamente elevado. Por essa razão, a introdução de animais contaminados nas colônias desencadeará uma rápida disseminação e em pouco tempo acabarão por comprometê-las de diferentes maneiras.

Além dos prejuízos que serão impostos à comunidade usuária, os patógenos comprometerão também as colônias instaladas no próprio biotério.

Dentre os prejuízos que serão observados com os agentes mais comumente encontrados destacamos:

- Interferência na reprodução diminuindo a fertilidade e causando a morte de animais:
 - ✓ Vírus de hepatite do camundongo (MHV)
 - ✓ Vírus Sendai
 - ✓ Vírus Sialodacrioadenite (SDAV) do rato
- Alta mortalidade de neonatos, anormalidades nos hormônios sexuais, alterações patológicas no trato reprodutivo, infecção em embriões causando alta taxa de aborto:
 - ✓ *Cryptosporidium* sp
 - ✓ Rotavírus

- Alteração de vários parâmetros reprodutivos: motilidade dos espermatozoides, implantação de embrião, ossificação do esqueleto do feto, alteração da citologia vaginal, prejuízos nos testes de fertilização *in vitro*, redução da fertilidade em até 50% e distúrbio na transferência de embriões, além de teratologia.

- ✓ *Mycoplasma pulmonis*

Embora a placenta e o sistema imunológico da mãe constituam uma importante 'barreira', existem patógenos capazes de contaminar os animais ainda durante a gestação, quer por rompimento da barreira placentária, quer por serem residentes da cavidade uterina.

Dentre eles, destacamos:

- Agentes que atravessam a barreira placentária:

- ✓ Retrovírus murino (leucemia, tumor mamário)
- ✓ Vírus da coriomeningite linfocitária (LCM)
- ✓ Vírus da ectromélie (poxvírus)
- ✓ Parvovirus (Kilhan rat- KRV, toolan-H1, MYM)
- ✓ *Clostridium piliforme*

- Infecção uterina (provavelmente sem passar a barreira placentária):

- ✓ *Pasteurella pneumotropica*
- ✓ *Salmonella* sp
- ✓ *Mycoplasma pulmonis*
- ✓ *Escherichia coli* (fase progestacional)

A técnica de derivação cesariana realizada sistematicamente (e em alguns casos mais de uma vez em gerações sucessivas), mostra-se bastante eficiente na erradicação desses patógenos.

A UTILIZAÇÃO DE UNIDADES ISOLADORAS EM ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Atualmente, diversos modelos de isoladores são confeccionados e utilizados para fins de experimentação.

Nos países do primeiro mundo, a aplicação dessa tecnologia é bastante comum. Em alguns países em desenvolvimento, como o Brasil, a utilização desse equipamento na pesquisa tem se acentuado de maneira significativa. A principal razão para essa mudança é a segurança que o equipamento oferece.

Dentre as inúmeras aplicações que justificam sua utilização, podemos citar:

- Os isoladores possibilitam a realização de experimentos com animais imunodeficientes como SCID, XID, NOD, NUDE e outros, obtidos por meio de manipulação genética como o *knockout*, assegurando qualidade e reprodutibilidade aos resultados.
- Essa tecnologia oferece segurança ao estudo com agentes zoonóticos.
- A produção de anticorpos em camundongos ou ratos tendo em vista a realização de *Map Test* (*Mouse Antibody Production Test*) ou *Rat Test* (*Rat Antibody Production Test*). Esses testes consistem na inoculação de animais SPF, VAF (*Virus Antibody Free*) imunocompetentes, com amostras de material biológico específico. Após quatro semanas, avalia-se a produção de anticorpos contra agentes infecciosos que pudessem estar presentes nas amostras. A técnica somente pode ser realizada em isoladores onde as condições são controladas, impedindo a ocorrência de interferências na produção dessas moléculas.

A APLICAÇÃO DE UNIDADES ISOLADORAS NA INDÚSTRIA

Com o advento dos isoladores, não apenas os laboratórios de pesquisa ou os centros de bioterismo se beneficiaram. Na indústria farmacêutica, por exemplo, os isoladores são utilizados em diversas etapas, estendendo-se desde a pesquisa de um novo fármaco até o seu envase. Além disso, o preparo de soluções, os testes de esterilidade e a manipulação de drogas tóxicas, entre outras rotinas, são realizados com o auxílio dessa tecnologia.

Nos países desenvolvidos, as indústrias farmacêuticas investem milhões de dólares em isoladores, uma vez que é imprescindível a qualidade dos processos na aprovação de novos princípios ativos. Atualmente, o nível de exigência dos processos instalados nessas indústrias estimulou o surgimento de empresas cuja atividade principal é desenvolver novos modelos de isoladores.

Entretanto, não é apenas na produção de fármacos que essa tecnologia se faz presente. A indústria eletrônica, por exemplo, também se beneficia da segurança oriunda das unidades isoladoras. Para elas, a produção e o armazenamento de componentes microeletrônicos, de forma que os mesmos fiquem protegidos da interferência de poeiras tóxicas, é um importante fator de qualidade no processo de fabricação.

Tillet (1999) descreveu o uso dos isoladores na indústria como uma alternativa para manter a sala limpa, pois é possível o preparo de produtos com níveis de riscos 2 e 3. O equipamento utilizado em produtos com nível de risco 2 apresentava paredes rígidas em acrílico e policarbonato. O equipamento para manipulação de produtos com nível de risco 3, por envolver a manipulação de patógenos perigosos e agentes citotóxicos, possuía um desenho capaz de prevenir a contaminação cruzada entre o operador e os produtos, bem como entre estes e o meio ambiente externo.

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS GNOTOBIÓTICAS E DOS ISOLADORES EM HUMANOS: IMUNODEFICIÊNCIA E CIRURGIAS

O comprometimento imunológico descrito como 'deficiência imune severa combinada' ou SCID (*Severe Combined Immune Deficiency*) é uma síndrome rara, congênita, que resulta na ausência da imunidade por células B e T. A doença foi identificada pela primeira vez em crianças, por volta de 1950 (Glanzmann & Rinkler, 1950; Hitzig et al., 1958). Os portadores dessa síndrome morriam antes de completarem um ano de idade.

Embora alguns pacientes SCID possam ser tratados através de transplante de medula óssea, quase sempre os doentes são notavelmente susceptíveis a infecções por uma série de agentes, e a maioria só sobrevive quando completamente isolados do ambiente exterior. Essa condição ímpar somente pode ser oferecida com unidades isoladoras, tais como a descrita por Travnick et al. (1977). O equipamento idealizado por esse autor possibilitou a manutenção de um bebê em condições estéreis e controladas após a realização da cesariana.

Travnick & Mandel (1987) relataram um caso com suposição de imunodeficiência anterior ao nascimento. A partir dessas considerações, foi possível realizar a cesariana em isolador com condições totalmente assépticas. Durante um mês, o bebê foi mantido no equipamento e nesse período foi possível investigar sua condição imunológica e realizar a colonização com bactérias de linhagens selecionadas, preparando-o para a repopulação da microbiota.

Tanto as experiências quanto as tecnologias realizadas em gnotobiologia têm beneficiado o homem de diferentes maneiras. Um exemplo é a influência nos cuidados com nascimentos prematuros e com neonatos de alto risco, observado na pediatria contemporânea.

Pacientes são mantidos em unidades isoladoras para prevenção de infecções pós-operatórias, tratamento de queimaduras e de sistema imunológico imunossuprimido (Cohn Jr & Heneghan, 1991), além de tratamento de pacientes com leucemia aguda (Trexler, Spears & Gaya, 1975).

Em cirurgias ortopédicas, o isolador desempenha um importante papel na prevenção de infecções pós-operatórias (Zucman & Benichou, 1978).

Hirsch, Renier & Pierre-Kalin (1978) mostraram a eficiência do isolador em cirurgias e a redução das infecções em pacientes que estavam em tratamento de hidrocefalia. Essa eficiência foi atribuída à eliminação de agentes contaminantes provenientes do ar (*airborn*) e à manipulação asséptica.

Trexler, Emond & Evans (1977) descreveram o uso de isoladores de plástico com pressão negativa para a manutenção de pacientes com suspeitas de infecções de risco como *lassa*, *marburg* e *virus ebola*. Com esse equipamento, pacientes foram mantidos por 32 dias, assegurando a integridade do ambiente hospitalar e eliminando os riscos para a equipe médica.

Doença como a leucemia é freqüentemente acompanhada pela imunodeficiência clínica, após o transplante de medula óssea. Pacientes mantidos em isoladores e sob sistema de barreiras apresentam menor incidência de doença GVHD (*enxerto versus hospedeiro*) após o transplante (Mahmoud et al., 1984).

A INFLUÊNCIA DA GNOTOBIOLOGIA NA INFRA-ESTRUTURA EM PESQUISA PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MODELOS

De certa forma, os isoladores permitem a manipulação do sistema imunológico, uma vez que, experimentalmente, camundongos imunodeficientes SCID/SCID (homozigotos) são utilizados como receptores de células derivadas do sistema imunológico do homem. Esses camundongos não possuem linfócitos T e B, embora tenham células hematopoéticas normais. Quando os camundongos CB17 SCID/SCID são inoculados com linfócitos humanos, os linfócitos sobrevivem e funcionam durante vários meses no animal, produzindo anticorpos e células T imunes. Esse sistema imunológico humano pode ser testado quanto a sua capacidade de compor resposta a uma vacina em experimentação, por exemplo, contra o HIV.

Entretanto, os camundongos SCID somente podem ser criados no interior de unidades isoladoras. É uma condição estrita, pois em ambiente aberto, mesmo que sanitariamente controlado, esses modelos podem reverter para a forma *Scid leaky*, imunologicamente anormal e descaracterizada por apresentar baixo título de imunoglobulinas. Portanto, os equipamentos asseguram que os animais manipulados possam permitir o estudo de doenças como a AIDS sob condições definidas e adequadas, bem como endossam qualificação de protocolos terapêuticos em condições apropriadas e isentas de riscos para o homem.

A introdução de genes exógenos em organismos vem sendo progressivamente utilizada em diversas áreas da biologia dos mamíferos. A maior parte desse trabalho tem sido realizada com camundongos, embora os mesmos princípios sejam aplicáveis a outros animais, como porcos, coelhos, ovelhas. Por essa razão, os camundongos transgênicos são animais modificados, possibilitam a expressão de genes *in vivo* e devem ser isolados de outros de forma a se evitar a disseminação genética na natureza oriunda, por exemplo, da fuga do animal manipulado. Outro caso no qual o animal geneticamente modificado é residente obrigatório desses equipamentos é na produção de animais *knockouts*. Estes têm, em sua maioria, comprometimento do sistema imune e, por isso, necessitam de tratamento diferenciado para que seu uso seja viável, quer seja para programas de reprodução, quer seja para a experimentação.

Em países desenvolvidos, é comum a utilização desses equipamentos e de suas tecnologias. Porém, em países da América Latina como o Brasil, a carência de programas que promovam a divulgação de seu uso é notória. Apenas algumas instituições e centros de pesquisa presentes na região Sudeste do País os utilizam e mantêm programas de formação de recursos humanos especializados em sua operação.

OUTROS EQUIPAMENTOS ORIGINADOS A PARTIR DESSAS TECNOLOGIAS

Nos países desenvolvidos, é muito grande a utilização de equipamentos oriundos da otimização das condições de ambiente.

Essas novas tecnologias não apenas reduzem os custos da construção ou da adequação física para biotérios de porte médio, mas principalmente permitem a instalação de biotérios experimentais com excelente nível de segurança e dentro das necessidades de cada espécie animal.

Em países como França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos é comum considerar esses equipamentos nos projetos de pesquisa ou de adequação física de biotérios de centros de pesquisa ou de produção animal.

Dentre esses equipamentos, destacam-se as estantes ou armários ventilados (Fig. 3).

Figura 3 – Estantes ventiladas para camundongos e ratos. Área instalada no Instituto de Pesquisas Energéticas (IPEX-SP)

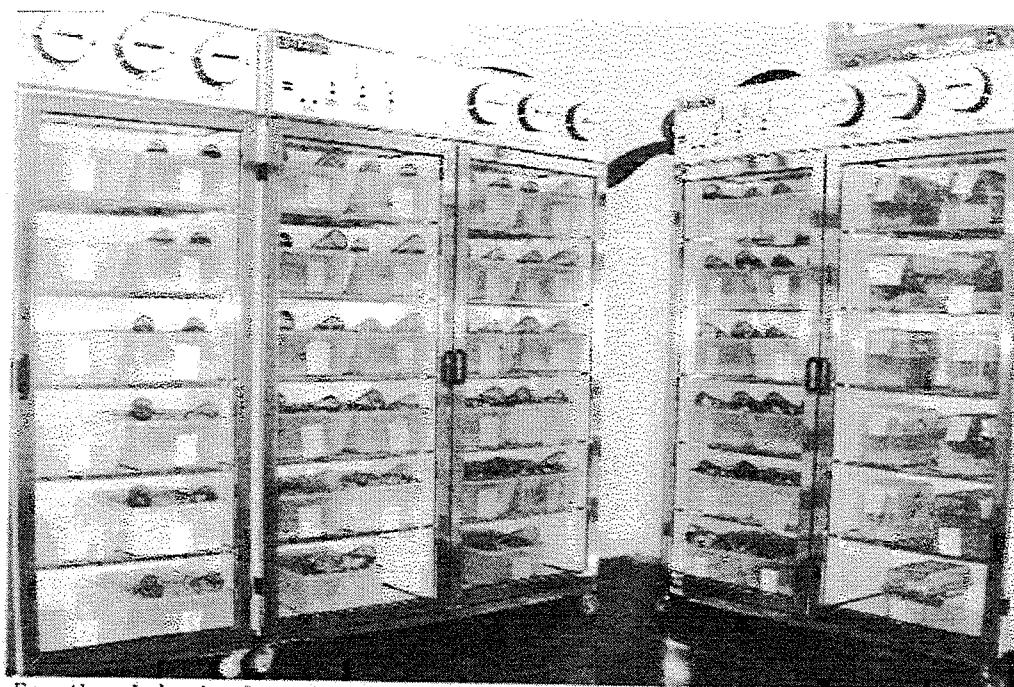


Foto: Alesco Indústria e Comércio Ltda.

ESTANTES OU ARMÁRIOS VENTILADOS

Atualmente, existem vários tipos de estantes que podem ser adotadas para a manutenção dos animais utilizados em experimentação, como camundongos, ratos, coelhos e outros.

Assim como os isoladores, as estantes ventiladas aumentam a segurança sanitária, reduzindo o risco de infecções que poderiam interferir nas pesquisas. São adequadas para laboratórios em função da otimização do espaço aliada ao manejo simples dos animais. É possível a manutenção de camundongos e ratos na mesma estante, pois o equipamento possui compartimentos independentes.

Normalmente, esse equipamento é confeccionado em material resistente às exigências das rotinas e tem capacidade para alojar uma razoável quantidade de animais. O sistema de 'insuflamento' do equipamento

possibilita o deslocamento de ar nos diversos níveis sobre as gaiolas, portanto a retirada de amônia e CO₂ é contínua. Assim, há eliminação dos odores provenientes das excretas dos animais, bem como dos poluentes por eles gerados.

No Brasil, diversas instituições de pesquisa possuem esses equipamentos, demonstrando que o uso dessa tecnologia tem crescido nos últimos anos, em virtude, sobretudo, da praticidade do equipamento, mas também graças à conscientização, por parte da comunidade, da influência das condições ambientais na obtenção de resultados reprodutíveis e universais.

MICROISOLADORES OU TOP FILTERS

Existem divergências para a definição e utilização desses equipamentos. A experiência nos permite inserir a observação de que a manutenção de colônias de camundongos e ratos em isoladores pressupõe uso contínuo e prolongado com total segurança. Nesse contexto, os microisoladores ou *top filters* não oferecem a mesma proteção aos animais. Os microisoladores ou *top filters* são utilizados para a manutenção de ensaios experimentais (sem risco de zoonoses). Procedimentos especiais devem ser adotados, tais como troca de gaiolas em fluxo laminar, entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COHN JR., I. & HENEHAN, J. B. Germfree animals and technics in surgical research. *American Journal Surgery*, 161(2):279-283, 1991.
- GLANZMANN, E. & RINKER, P. Essentielle lymphocytophthise. Ein neues Krankheitsbild aus der Säuglingspathologie. *Annals Paediatrica*, 175:1-32, 1950.
- GORDON, H. A. Germfree animals in research: an extension of the pure culture concept. *Triangle*, 7(3):108-121, 1965.
- HIRSCH, J. F.; RENIER, D. & PIERRE-KAHN, A. Influence of the use of a surgical isolator on the rate of infection in the treatment of hydrocephalus. *Childs Brain*, 4(3):137-150, 1978.
- HITZIG, W. H. et al. Agammaglobulinämie und A lymphocytose mit Schwund des lymphatischen Gewebes. *Helv Paediatrica Acta*, (13):551-585, 1958.
- MAHMOUD, H. K. et al. Laminar air flow versus barrier nursing in marrow transplant recipients. *Blut*, 49(5):375-381, 1984.
- SEBESTENY, A. & LEE, P. Unidirectional air flow surgical isolator for hysterectomy of mice. *Laboratory Animal*, 7(3):271-277, 1973.
- TILLET, L. Barrier isolators as an alternative to a cleanroom. *American Journal Health-System Pharmacy*, 15, 56(14):1433-1436, 1999.
- TRAVNICEK, J. & MANDEL, L. Germfree newborn baby. *Nahrung*, 31(5-6):631-633, 1987.
- TRAVNICEK, J. et al. Equipment for germfree caesarean section and baby care. *Folia Microbiology (Praha)*, 22(6):523-526, 1977.
- TRENLER, P. C.; SPEARS, A. S. & GAYA, H. Plastic isolators for treatment of acute leukaemia patients under "germfree" conditions. *British Medical Journal*, 6, 4(5996):549-552, 1975.

- TREXLER, P. C.; EMOND, R. T. & EVANS, B. Negative-pressure plastic isolator for patients with dangerous infections. *British Medical Journal*. 27(2):559-561, 1977.
- ZUCMAN, J. & BENICHOU, J. Use of an isolator (so called "bubble") in orthopaedic surgery. *Acta Chirurgie Belgium*. 77(1):39-44, 1978.

BIBLIOGRAFIA

- COATES, M. E. & GUSTAFSON, B. E. (Eds.). *The Germfree Animal in Biomedical Research*. London: London Laboratory Animals Ltda., 1984.
- MROZEK, M. et al. Efficiency of air filter sets for the prevention of airborne infections in laboratory animal houses. *Laboratory Animal*. 28(4):347-354, 1994.
- PASSOS, L. A. C. & ALVES, D. P. Isoladores. In: DE LUCA, R. R. et al. (Orgs.) *Manual para Técnicas em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.
- TREXLER, P. C. & REYNOLDS, L. I. Flexible film apparatus for the rearing and use of *germfree* animals. *Applied Microbiology*. 5:406-412, 1957.
- TREXLER, P. C. *Gnotobiotics*. In: FOSTER, H. L. & SMALL, D. J. (Orgs.) *The Mouse in Biomedical Research*. London: Fox Academic Press, 1983. v.III.
- UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE (UFAW). *The Ufaa Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.

Anexo III: Passos, L.A.C., Guaraldo, A. M. A., Alves, D. P., Pire, L. A., Santana, T. M., Dini, T. H. C. Capítulo 26 Criopreservação de Embriões Murinos em Biotérios **IN:** Animais de Laboratório – Criação e Experimentação De Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. (org.) Editora Fiocruz. p.225- 245, 2002.



Animais de Laboratório

criação e experimentação

Antenor Andrade
Sergio Correia Pinto
Rôsilene Santos de Oliveira
Organizadores



Copyright © 2002 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / EDITORA

ISBN: 85-7541-015-6

Capa, projeto gráfico e editoração eletrônica
Angélica Mello

Cópidesque e revisão
Claudia Cristiane Lessa Dias
Janaína Souza Silva

Supervisão editorial
Marcionília Cavalcanti de Paiva

Catálogo-na-fonte
Centro de Informação Científica e Tecnológica
Biblioteka Lincoln de Freitas Filho

A598a Andrade, Antenor (org.)
Animais de Laboratório: criação e experimentação. / Organizado por Antenor Andrade, Sérgio Correia
Pinto e Rosilene Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.
388p., il., tab., graf.

I. Animais de laboratório 2. Manuais de Laboratório [tipo de publicação] I. Pinto, Sérgio Correia (org.)
II. Oliveira, Rosilene Santos de (org.).

CDD - 20.ed. - 619

2002
Editora Fiocruz
Av. Brasil, 4036 – 1º andar – sala 112 – Manguinhos
21040-361 – Rio de Janeiro – RJ
Tels.: (21) 3882-9039 e 3882-9041
Telefax: (21) 3882-9007
e-mail: editora@fiocruz.br
<http://www.fiocruz.br>



Criopreservação de Embriões Murinos em Biotérios

Luiz Augusto Corrêa Passos
Ana Maria Aparecida Gnavaldo
Delma Pegolo Alves
Luiz Afonso Pires
Thiago Marinho Santana
Thiago Henrique Cinodon Dini

INTRODUÇÃO

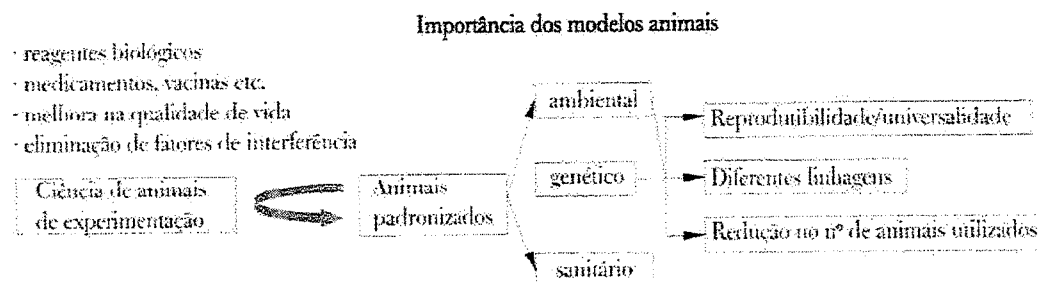
O desenvolvimento científico e tecnológico influi diretamente na qualidade de vida da população humana. Novas técnicas, pesquisas e tendências são assimiladas diariamente pela sociedade, tornando-se, rapidamente, eventos corriqueiros. Na verdade, estamos de tal modo acostumados com certos avanços que sequer pensamos no quão difícil era, há alguns anos, executar certas tarefas, curar certos males ou mesmo escrever um texto de fácil entendimento.

Particularmente nas ciências biomédicas, os avanços nos propiciaram um melhor entendimento da natureza da qual fazemos parte. Palavras como DNA, clonagem, ecossistema e genoma já fazem parte do vocabulário de pessoas que não estão envolvidas com a execução direta da ciência, mas que são diretamente influenciadas por ela. O sucesso da pesquisa científica não pode ser negado. O fato de hoje confiarmos nos serviços médicos, abandonando técnicas de curandeirismo, e dispormos de um arsenal cada vez mais completo de vacinas, drogas e técnicas cirúrgicas se deve a esse avanço tecnológico. Entretanto, um resultado científico somente é válido se possuir reprodutibilidade.

Com isso, fez-se necessário o surgimento de um outro ramo da ciência, capaz de fornecer modelos animais adequados às necessidades dos pesquisadores e que, acima de tudo, pudessem garantir tal reprodutibilidade. Além disso, com o surgimento desse novo ramo e de modelos animais, a interferência nos resultados foi sendo sistematicamente reduzida, garantindo um dinamismo cada vez maior à pesquisa científica.

Assim, o estabelecimento da ciência e tecnologia em animais de laboratório possibilitou a padronização dos modelos tanto do ponto de vista de seus aspectos biológicos e de saúde quanto das condições de ambiente, nas quais os mesmos devem ser mantidos. Entre essas novas exigências, destacam-se a adequação do espaço físico, a qualidade do modelo animal e o controle dos materiais e insumos necessários à manutenção das colônias. Como consequência dessa padronização sanitária, genética e ambiental, passamos a observar uma redução no número de animais utilizados, assegurando a universalidade e a reprodutibilidade experimentais, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias (Fig. 1).

Figura 1 – Algumas das consequências da padronização dos modelos animais



Entre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se a criopreservação de embriões murinos, assunto que será discutido no decorrer deste capítulo.

HISTÓRICO DA MANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES

No fim do século XIX, cientistas interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram os primeiros ensaios com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem a manipulação de embriões. Inicialmente, o coelho foi o modelo experimental adotado, tendo em vista suas características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do ovo (o que facilitava a manipulação) e a ovulação induzida pelo acasalamento, fato de elevada conveniência para a definição precisa da idade dos embriões.

Entretanto, os resultados obtidos não foram totalmente satisfatórios. As dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios de coleta e cultivo até então utilizados consistiam em barreiras técnicas a serem rompidas.

No princípio do século XX, juntamente com o desenvolvimento da química fina responsável pela obtenção de reagentes livres de impurezas, que poderiam ser críticas do ponto de vista toxicológico, a embriologia passou por progressos significativos com profundos reflexos no sucesso de coleta e cultivo de embriões no estágio de pré-implantação.

Assim, apenas na década de 40 do século XX, com Hammond, o cultivo de embriões pôde ser conduzido de maneira sistemática até a fase de 'blastocisto'. Todavia, estágios de desenvolvimento mais precoces ainda careciam de ajustes na formulação dos meios. Conseqüentemente, tornou-se impossível que os embriões se enquadrassem em índices de qualidade, possibilitando maiores avanços, embora certas barreiras técnicas tivessem sido rompidas (vias de acesso para implante, instrumental básico adequado etc.).

Finalmente, em meados da década de 50, Withen propôs uma nova formulação, que passaria a ser utilizada tanto na coleta quanto no cultivo de embriões. Essa nova formulação se mostrou bastante eficiente, ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso. Posteriormente, outros fatores relacionados à importância das condições de cultivo para o sucesso do implante seriam apontadas por Anne MacLaren.

Com isso, estavam solucionados os aspectos básicos, porém essenciais, das etapas de coleta, congelamento, descongelamento e implante de embriões. A década de 60 foi de grande importância para tal desenvolvimento. Esforços foram realizados de forma a esclarecer tanto as necessidades nutricionais dos embriões quanto os mecanismos envolvidos na cinética da água em células submetidas a temperaturas abaixo de zero, e sua influência na viabilidade dos embriões congelados.

Agora já é possível o estabelecimento de bancos de embriões – local onde podem ser armazenadas grandes quantidades de linhagens (elevado estoque potencial) por um período indeterminado –, nos quais estes podem estar protegidos tanto de contaminações sanitárias quanto de uma deriva genética.

Quadro 1 – Histórico resumido da embriologia experimental

- **Fim do século XIX:** Uso de coelhos para estudos de embriologia (primórdios da embriologia experimental);
- **1875:** Van Beneden – descrição dos estágios de pré-implantação;
- **1890:** Heape – análise e manipulação do óvulo (primeiros esforços visando ao implante);
- **1929:** Lewis & Gregory – estudo de mórulas em cultura;
- **1949:** Hammond – cultivo de embriões de camundongos de 8 células até a fase de blastocisto;
- **1951:** Beatty – implante de embriões de camundongos;

Quadro 1 – Histórico resumido da embriologia experimental (continuação)

- 1956: Wilten – sucesso no cultivo de embriões de camundongos de uma célula até blastocisto;
- 1958: Anne McLaren – demonstra que as condições de cultivo interferem no sucesso do implante;
- 1963: Mazur – diminuição de energia cinética da água em células submetidas a temperaturas abaixo de zero e a probabilidade de congelamento intracelular;
- 1965: Brinster – nutrição de embriões na fase de pré-implantação e técnica de cultivo em microgota;
- Década de 70: Brinster – banco de embriões;
- 1971: Cultivo sistemático pós-descongelamento de embriões de camundongos (estudos de viabilidade);
- 1974: Banco de embriões influenciando o futuro desenvolvimento genético;
- 1975: Sobrevida de embriões de ratos pós-congelamento.

CRIOPRESERVAÇÃO E TECNOLOGIA DE MANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES

IMPORTÂNCIA E ASPECTOS BÁSICOS

A crioconservação de embriões, tanto em biotérios quanto em instituições de pesquisa, é uma poderosa ferramenta. Por meio da manipulação de embriões (em todos os seus níveis), pode-se interferir em diversos protocolos experimentais, sendo que em alguns deles esta tecnologia é absolutamente indispensável. Além desses aspectos, em nosso dia-a-dia nos deparamos, sem nos darmos conta, com outros benefícios advindos dessa tecnologia. Vejamos alguns exemplos:

• Testes de Toxicidade (Efeitos Embriotóxicos)

Consiste na utilização de embriões para a observação do caráter toxicológico de diferentes drogas. Um exemplo é seu emprego no teste de produtos (novos ou não) que serão utilizados na agricultura.

• Caracterização Toxicológica de Fármacos (Teratogênicos)

Certas drogas podem alterar o desenvolvimento normal de organismos. Tais drogas são chamadas 'teratogênicas' e a importância de seu reconhecimento se evidencia ainda mais quando de seu uso em gestantes. Utilizando a tecnologia de manipulação de embriões, pode-se prevenir efeitos indesejáveis de uma droga, primeiramente no embrião e, posteriormente, no próprio feto.

• Medicina Humana Aliada à Reprodução

Ensaio com embriões, utilizando diferentes protocolos, podem auxiliar em programas de reprodução humana como a fertilização *in vitro*, bem como na análise embrionária de distúrbios fetais, entre outros.

A TECNOLOGIA DE MANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES ALIADA À PRODUÇÃO DE TRANSGÊNICOS E QUIMERAS

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS

Na década de 60 do século XX, Krystof Tarkowski utilizou blastômeros para a quebra da zona pelúcida, visando ao desenvolvimento da primeira quimera. Beatrice Mintz propôs um novo processo e obteve sucesso na digestão da zona pelúcida de um embrião. Finalmente, Gardner conseguiu injetar células isoladas de embriões doadores em blastocistos hospedeiros (quimera).

Rudolf Jaenich e Beatrice Mintz, na década de 70, executaram a primeira introdução direta de material genético em embriões de camundongos, munindo-se do DNA do vírus SV-40. Paralelamente, ocorreu a

diversificação no uso das quimeras, sendo que essa utilização se estendia a estudos imunológicos, padrões de pigmentação, diferenciação sexual e estudos de diferenciação celular, entre outros.

A década de 80 foi marcada pela microinjeção de gene clonado (no caso o gene tk do vírus da herpes simplex) em fibroblasto cultivado, possibilitando, assim, a manipulação de material para introdução posterior e influenciando na concepção do transgênico. Ainda nesse período, Gordon executou a microinjeção do gene clonado em pró-núcleo de embriões de uma célula, aproximando-se da transgênese como estabelecida atualmente.

MATERIA-PRIMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MODELOS ESPECÍFICOS

A abordagem da utilização de tecnologias de manipulação de embriões em pesquisa é deveras ampla. Com elas, podem ser manipulados desde embriões de uma célula até indivíduos em estágio de blastocisto, permitindo, dessa forma, a produção de transgênicos, *knockouts* e quimeras, entre outros.

A 'transgenia' é uma ferramenta científica que possibilita a criação de novos modelos. Esse processo se dá tanto pela microinjeção de fragmentos de DNA em um dos pró-núcleos (Fig. 2) quanto pela produção de quimeras formadas a partir da incorporação de células de uma outra linhagem no blastocisto, de uma linhagem receptora. As células em questão pertencem à massa celular interna (MCI) de um embrião da linhagem doadora e serão introduzidas na blastocela do embrião receptor. Após serem incorporadas, as características da linhagem doadora serão manifestadas na linhagem receptora. Assim sendo, indivíduos originados por essa técnica terão informações genéticas das duas linhagens. É possível, portanto, que o animal apresente em seu tecido somático heranças de duas origens genéticas diferentes (Fig. 3).

Há ainda uma técnica que consiste na fusão das duas técnicas anteriores para a obtenção de transgênicos. Por meio dessa técnica os animais quiméricos serão selecionados após a diferenciação celular, sendo o enfoque principal destinado àqueles cuja característica desejada esteja presente nas células reprodutivas (gametas) (Fig. 4).

Figura 2 – Desenho da transgênese por microinjeção

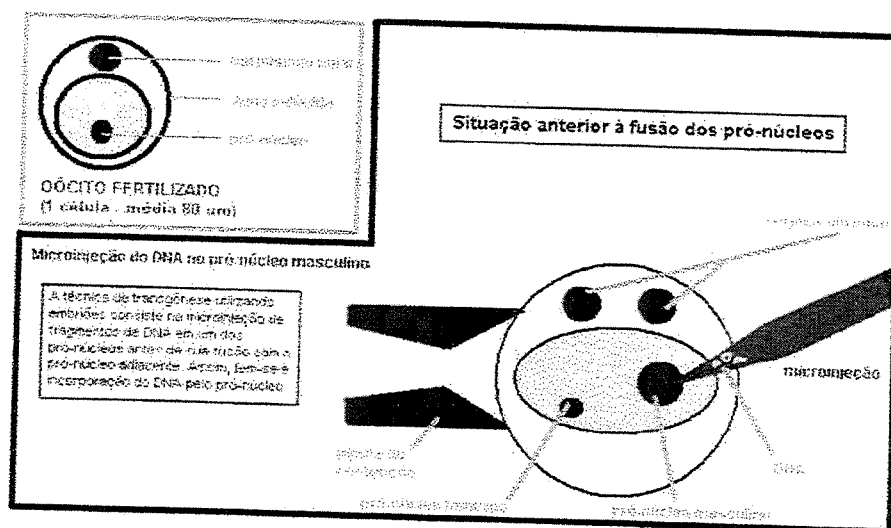


Figura 3 – Confeção da quimera

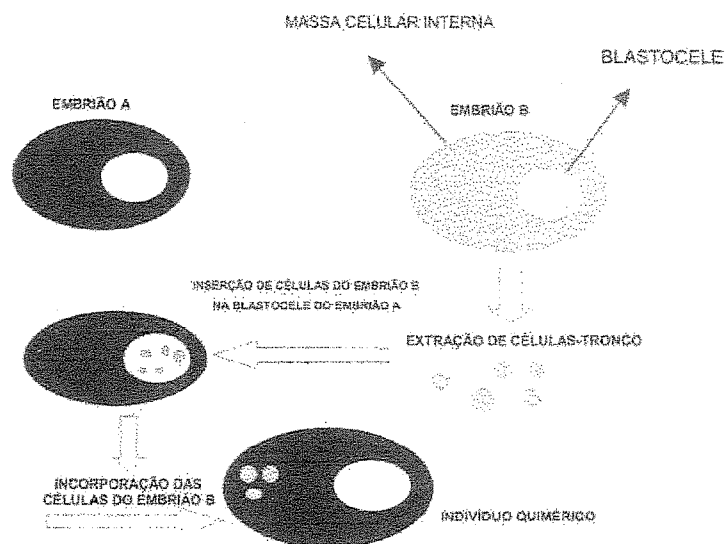
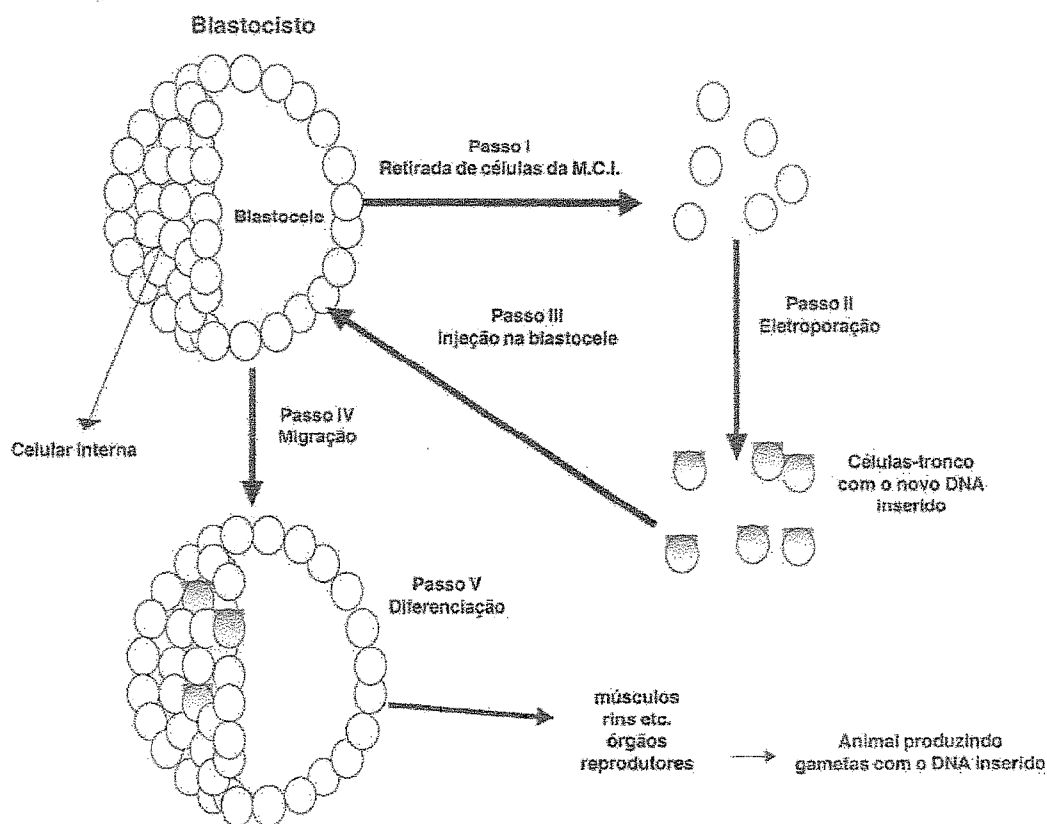


Figura 4 – Confeção de uma quimera utilizando a transgênese para a obtenção de animais com células germinativas geneticamente alteradas



A TECNOLOGIA DE MANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES E A PRODUÇÃO DE MODELOS ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS: QUIMERAS, TRANSGÊNICOS E *KNOCKOUTS*

A instalação de laboratórios de manipulação de embriões em Centros produtores de modelos animais, além de possibilitar importantes vantagens como o banco de embriões (perpetuação dos padrões sanitários e genéticos originais dos animais) e a descontaminação para agentes de transmissão vertical (como no caso de alguns vírus), também se mostra essencial nas etapas de produção de animais de laboratório geneticamente modificados.

Esses animais geneticamente modificados podem nos fornecer modelos especiais para pesquisas específicas, permitindo, por exemplo, que se estude os efeitos funcionais do produto de um gene específico. Isso é possível uma vez que um camundongo transgênico pode apresentar diferentes características, como super expressar o gene em um tecido específico (permitindo a sua análise *in vivo*), ou até mesmo impedir que um determinado gene se expresse constituindo-se em um modelo *knockout* para um outro.

Nessa parte do capítulo, iremos discutir objetivamente a aplicação da tecnologia de manipulação de embriões na obtenção de modelos.

Para se criar um camundongo transgênico, uma sequência de DNA, diferente daquela já existente na célula, é introduzida. Esta 'nova' sequência é conhecida como estrangeira, e pode ser de diferentes origens.

A introdução pode ser realizada por diferentes métodos, dependendo dos objetivos. A mais divulgada e conhecida é a utilização de um micromanipulador que permite uma microinjeção em um dos pronúcleos de óvulos fertilizados (ovos). (Fig. 2).

Após essa injeção, os ovos são implantados em ovidutos de fêmeas receptoras pseudoprenhas, de forma que se desenvolva uma gestação normal. Normalmente, a taxa de sucesso é muito baixa, mesmo com a injeção de algumas centenas de cópias de um determinado gene. A literatura registra o índice máximo de 25% dos animais nascidos serem transgênicos para as cópias inseridas.

As cópias do transgene, na quase totalidade das vezes, são inseridas em sítios aleatórios de cromossomos e transmitidas como uma herança mendeliana simples. O fato da integração usualmente ocorrer antes da replicação do DNA permite que cerca de 75% dos neonatos transgênicos portem o transgene em todas as suas células, incluindo as células germinativas (reprodutoras). Dessa forma, os camundongos 'fundadores', que carregam o transgene em heterozigose, podem ser programadamente acasalados, segundo a conveniência dos pesquisadores.

Talvez a maior contribuição dos animais transgênicos seja o fato de que a tecnologia de transgênese permite que se estude a expressão de genes em um tecido específico. Isto é factível, uma vez que se pode ligar sequências codificadoras do gene, que se pretende estudar, a sequências regulatórias responsáveis por sua expressão em um tecido (do órgão a ser pesquisado).

Atualmente, os transgenes podem também ser expressos segundo um estímulo externo causado, por exemplo, por uma droga ou por hormônios. Nesse caso, utilizam-se promotores capazes de responder a esses agentes.

Outro método muito poderoso na produção de modelos animais geneticamente modificados é a manipulação de genes visando à produção de animais *knockouts* (os animais recebem esse nome em virtude de terem um gene inativado, 'nocauteado').

O animal *knockout* possui um gene alterado intencionalmente, de forma que ele não funcione (em decorrência a uma ruptura), ou é o produto de sua expressão que está muito diferente e por esta razão também não funciona (alteração na sequência do gene – mutação). Em ambos os casos, o animal não apresentará um padrão de normalidade para o gene, permitindo estudos mais detalhados de sua função *in vivo*. Uma técnica muito utilizada na produção de animais *knockout* é a recombinação homóloga.

RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Por meio dessa técnica, a integração de uma determinada sequência introduzida na célula passa a ser parcialmente dirigida. Isso é possível sempre que se conheça a sequência de bases do gene que se quer inativar na célula receptora. Para tanto, a sequência do DNA que será introduzida sofre modificações em laboratório (conhecidas como construção), que permitem sua recombinação, por homologia, à sequência presente no gene-alvo endógeno, podendo substituí-lo.

Os materiais utilizados, nesse protocolo, são as células-tronco (ou células embrionárias pluripotentes, também conhecidas como *stem cells*), normalmente extraídas de embriões na fase de blastocisto. Essas células são manipuladas para a inserção da sequência de DNA, e uma das metodologias muito utilizada é a eletroporação. O eletroporador é um aparelho que abre minúsculos poros na membrana celular, permitindo a entrada do fragmento de DNA. Após a introdução do DNA, as células tratadas são selecionadas com o intuito de separar aquelas que sofreram recombinação homóloga.

O pesquisador Mario Capecchi e seus colaboradores, da Universidade de Utah, nos Estados Unidos, descreveram, em 1986, um método bastante eficiente e ainda muito utilizado para a identificação e seleção das células recombinantes. Esse método é conhecido como 'dupla seleção' e se fundamenta na expressão de *genes repórter* dentro e ao lado da construção gênica.

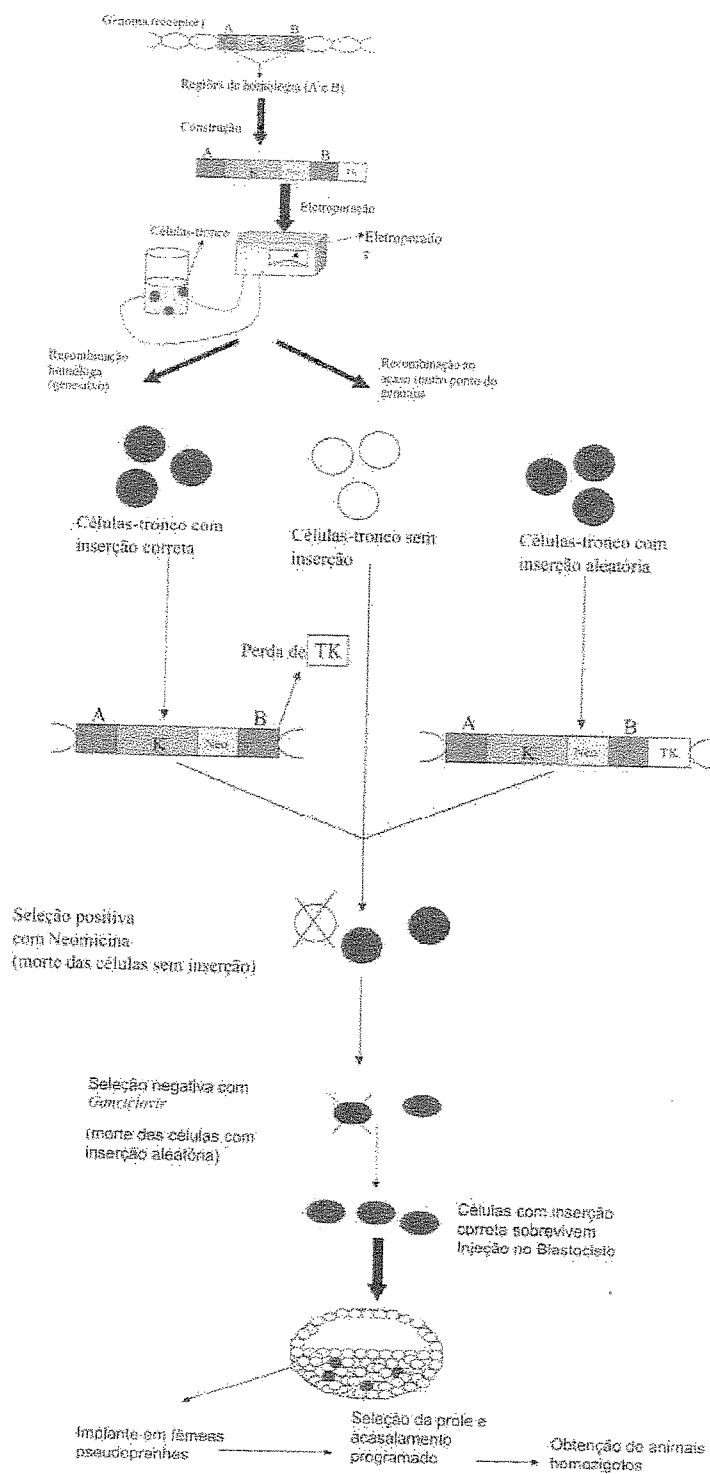
O método se baseia no fato da construção apresentar sequências homólogas àquelas presentes no genoma receptor nos dois lados do gene que se quer inativar (por exemplo, o gene 'K'). Dentro das sequências homólogas, é ligada ao gene 'K' e também a um gene que dá resistência ao antibiótico, a neomicina (gene 'Neo').

No lado de fora dessa região, que contém as sequências de homologia e também o gene 'Neo', é colocado um outro gene, o gene da timidina quinase (gene 'tk'). Após a transfecção em um eletroporador (conforme escrito acima), as células são cultivadas em meio de cultura. Nesse meio, é colocado o antibiótico neomicina (ou um análogo dele, o G418) para que as células possam ser selecionadas. Das células colocadas no meio, apenas aquelas que integraram o gene 'Neo' de forma estável em seu genoma sobreviverão, pois serão resistentes ao antibiótico. As demais células morrerão. Esse processo é conhecido como 'seleção positiva'.

As células sobreviventes são então cultivadas em outro meio que contém uma droga denominada ganciclovir, cuja função é matar as células nas quais o gene 'tk' está se expressando. Esse processo é conhecido como 'seleção negativa', e se baseia no fato de que quando a recombinação ocorreu ao acaso (e por esta razão não é homóloga), o gene 'tk' permaneceu ligado ao gene 'K', e as células puderam, então, ser selecionadas.

As células que sofreram recombinação homóloga perdem o gene 'tk', pois ele não está na região de homologia. As células sem o gene 'tk' não morrem na presença de ganciclovir, podendo ser cultivadas, antes de serem introduzidas, no embrião (quimérico) que será implantado nas fêmeas receptoras pseudoprenhes (Fig. 5).

Figura 5 – Esquema para a produção de modelos por recombinação homóloga



BANCO DE EMBRIÕES

REPOSIÇÃO IMEDIATA DAS LINHAGENS

O banco de embriões já é uma realidade em alguns biotérios e, dada a sua simplicidade, deveria ser de uso rotineiro em todas as instituições. Com essa ferramenta, pode-se oferecer toda a segurança às colônias, uma vez que possibilita a reposição imediata das linhagens.

As colônias de fundação estão sujeitas a acidentes que não podem ser totalmente evitados, mesmo com programas de prevenção. Assim sendo, faz-se necessária uma técnica que permita a sua reposição. Na década de 80, no The Jackson Laboratory, localizado em Bar Harbor, Maine, nos Estados Unidos, um incêndio acabou por dizimar uma grande parte das matrizes lá existentes. Porém, devido a um banco de embriões completo e funcional, os pesquisadores puderam restabelecer as colônias sem maiores consequências para o funcionamento do centro.

Além do prejuízo decorrente da perda de matrizes, os acidentes em biotérios podem comprometer as atividades de pesquisa que utilizam os modelos fornecidos por eles, gerando graves consequências. Por essa razão, a reposição imediata das colônias é muitas vezes a única alternativa para minimizar tais efeitos negativos. Com o auxílio de um banco de embriões funcional e operante, é possível o repovoamento rápido e eficiente das colônias.

PERPETUAÇÃO DE PADRÕES GENÉTICOS E SANITÁRIOS

Uma outra grande vantagem no estabelecimento de um banco de embriões é a perpetuação dos padrões sanitários e genéticos. Através desse banco, linhagens podem ser conservadas em nitrogênio líquido, preservando, assim, suas características originais sem que haja perigo de interferência por contaminações genéticas ou sanitárias.

A contaminação genética ocorre por meio da propagação de um gene não original dentro de uma linhagem mantida no biotério. Isso pode ser consequência de falhas humanas ou materiais, que permitem o escape de um animal de sua gaiola e sua entrada em outra com animais de linhagem diferente. A ocorrência da cópula irá certamente definir uma progênie geneticamente contaminada. Isso é ainda mais grave nos casos em que duas linhagens de constituição genética diferente, mas de mesma aparência (fenótipo), são mantidas juntas em uma mesma sala. Nesse caso, a progênie não poderá ser diferenciada pela coloração e, portanto, a contaminação terá grande chance de se incorporar na colônia, descaracterizando-a. Do mesmo modo, uma contaminação sanitária (por vírus, fungos, bactérias, protozoários, por exemplo) também irá causar a descaracterização da linhagem.

Ambas as contaminações comprometem a reprodutibilidade e a universalidade experimentais. A universalidade define a propriedade de um resultado obtido ser válido em qualquer centro de pesquisa, desde que realizado com o mesmo modelo animal e nas mesmas condições. Já a reprodutibilidade representa a garantia de que o resultado experimental será o mesmo se repetido em épocas diferentes, utilizando o mesmo modelo nas mesmas condições. O advento do banco de embriões viabilizou essas metas.

ESTOQUE POTENCIAL DE LINHAGENS

A manutenção de diversas linhagens em um biotério é, muitas vezes, um desejo justificável da comunidade científica, uma vez que permite o desenvolvimento de vários ensaios experimentais. Entretanto, isso é muito caro e exige a adoção de diversas outras providências, tais como capacitação de recursos humanos, além da adequação dos espaços físicos (algumas vezes por exigência técnica da própria linhagem) e dos insumos básicos para a manutenção dos animais. Os embriões do banco não possuem tais necessidades, bastando-lhes um suprimento de nitrogênio líquido para que permaneçam congelados.

Assim, o estabelecimento do banco permite ao biotério a manutenção de um grande número de linhagens a baixo custo. Além disso, pode-se otimizar a programação de entrega de animais à comunidade usuária. Certas linhagens, por permanecerem durante muito tempo sem solicitação de uso, são criopreservadas, podendo ser descongeladas e reimplantadas no Centro, caso haja a necessidade.

DESCONTAMINAÇÃO

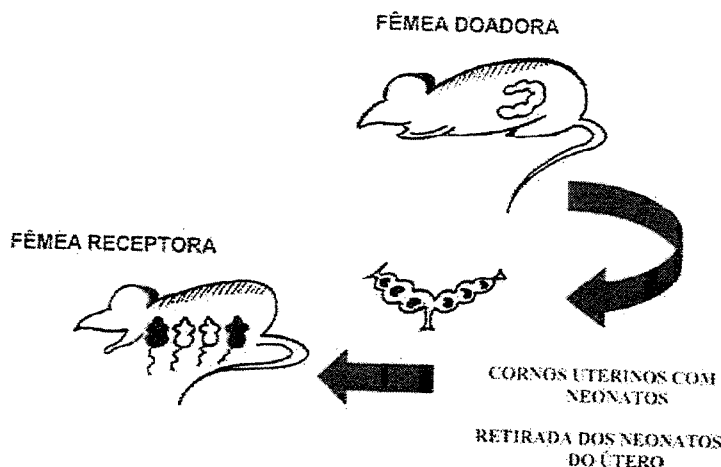
AUXÍLIO A TÉCNICA DE DERIVAÇÃO CÉSARIANA

A técnica de derivação cesariana vem sendo amplamente utilizada como forma de suporte a programas de erradicação de patógenos em colônias contaminadas de camundongos e ratos. Também chamada de histerectomia (Fig. 6), é um procedimento bastante simples, porém de relativa eficiência, uma vez que nos casos de contaminação por patógenos de transmissão vertical (como alguns vírus e micoplasma, por exemplo), o sucesso na eliminação total do agente pode ser comprometido. Isso ocorre porque alguns patógenos atravessam a barreira placentária e contaminam o feto ainda em desenvolvimento no útero materno.

Quando associada a programas de coleta, lavagem e transferência de embriões, o número de casos bem-sucedidos de descontaminação por esses agentes aumenta significativamente. A zona pelúcida do embrião é uma barreira de proteção deveras eficiente e, durante a execução do protocolo, as repetidas lavagens, as quais os embriões são submetidos, retiram por arraste os contaminantes aderidos a ela.

Assim, a obtenção de colônias *virus-free* e axênicas é assegurada com a execução de uma ou duas histerectomias, seguida de acasalamentos programados para a coleta e transferência de embriões em fêmeas receptoras, comprovadamente livres de patógenos.

Figura 6 – A técnica de histerectomia ou derivação cesariana



TRANSPORTE FACILITADO

Pode-se, com o apoio dessa tecnologia, transportar com segurança e facilidade um grande número de embriões de diferentes linhagens e espécies de animais reduzindo-se, portanto, custos e problemas relacionados ao transporte de animais em maior volume ou de grande porte.

REDUÇÃO DE CUSTO DAS COLÔNIAS DE FUNDAÇÃO

Em centros que produzem animais sanitária e geneticamente certificados, o custo da manutenção das colônias de fundação é muito elevado. Esse fato é decorrente dos cuidados necessários para a manutenção desses animais (acasalamentos, isolamento, alimentação, controle de qualidade etc.). Por meio do estabelecimento do banco de embriões, o número de casais necessários nas colônias de fundação é drasticamente reduzido, acarretando uma redução nos custos dessas matrizes.

TREINAMENTO DE PESSOAL

Finalmente, uma consideração cabível é a importante contribuição dessa tecnologia para a equipe de técnicos. O contato com esse trabalho, aparentemente sofisticado, tem efeito estimulante sobre a equipe, que se sente muito valorizada.

PRINCIPAIS ETAPAS DA TECNOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO

O estabelecimento de uma rotina para o congelamento de embriões acontece em várias etapas e apresenta diferentes necessidades. Para melhor compreensão, nós as separamos em duas partes.

PARTE 1

Necessidades Gerais (preparo dos materiais, drogas e animais)

Para a realização da técnica, é indispensável o preparo de alguns itens.

Dentre eles destacam-se os seguintes materiais:

- meios de coleta e cultivo (Brinster, PB1, M16, Whitten etc.)
- machos vasectomizados
- fêmeas doadoras (superovulação e acasalamento normal);
- hormônios (estimulante de folículos e huteinizante)
- drogas e anestésicos
- materiais cirúrgicos

PARTE 2

Coleta de Embriões

Os embriões são a matéria-prima utilizada para a formação do banco. Sua obtenção é o princípio de todo o processo e exige os seguintes materiais:

- preparo do meio de coleta (podem ser utilizados diferentes meios, como PB1 e Han F10)
- preparo dos capilares de manipulação
- seringa e agulha para a lavagem do oviduto
- placas de Petri descartáveis
- tesouras de ponta romba e fina
- pinças
- fêmeas doadoras (acasaladas de forma programada com ou sem superovulação)

Congelamento

A etapa de congelamento dos embriões é, a despeito da simplicidade, extremamente crítica. A qualidade do meio utilizado, associada ao preparo dos materiais, determina o sucesso no congelamento, preservando a viabilidade dos embriões. Nessa etapa, a atenção deve ser para os seguintes materiais:

- preparo dos meios de congelamento. Esses meios são obtidos a partir da solubilização de substâncias crioprotetoras no meio de coleta (podem ser utilizadas diferentes substâncias para a proteção dos embriões, como DMSO, propileno glicol etc.);
- preparo de micro capilares de manipulação;
- preparo dos minitubos para acondicionamento dos embriões em meio a solução crioprotetora (existem diversos modelos disponíveis; é fundamental que possam ser rotulados);
- disposição dos embriões nos minitubos e transferência destes para o banho refrigerado;
- transferência dos minitubos para os reservatórios (contêineres) com nitrogênio líquido.

Descongelamento

De certa forma, juntamente com o cultivo, esta etapa monitora as anteriores. No descongelamento, os embriões receberão um tratamento que permitirá o retorno a mesma situação biológica que se encontravam logo após a sua retirada do interior do oviduto da fêmea doadora. Esse tratamento consiste na colocação de um mesmo volume de um meio, sem crioprotetor (isotônico), ao meio recém-extraído do minitubo e que contém os embriões. Esse procedimento visa a diluir o crioprotetor, pois, na temperatura ambiente, o mesmo é tóxico e compromete a viabilidade dos embriões. Após três diluições seriadas, os embriões podem ser transferidos para um meio de cultivo isotônico.

- retirada dos minitubos do reservatório para descongelamento dos embriões;
- deposição dos embriões em meio de cultura (reidratação);
- cultivo de embriões em estufa de CO₂, pelo período de 12h a 14h, na temperatura de 37 °C e percentual de 4,5% de CO₂;
- observação dos embriões descongelados;
- transferência de embriões para as fêmeas receptoras pseudoprenhes.

Implante

Após o descongelamento, o cultivo ou mesmo quando se deseja realizar uma transferência a fresco para descontaminação, os embriões deverão ser introduzidos na fêmea receptora preparada para recebê-los. Este preparo é a indução de uma pseudoprenhez na fêmea receptora, obtida a partir de sua colocação junto a um macho vasectomizado. Isto possibilita que a fêmea desenvolva uma fisiologia similar àquela observada na gestação normal, garantindo aos embriões um ambiente próximo ao observado nesse tipo de gestação. O local onde os embriões serão introduzidos é o mesmo de onde eles foram retirados: o oviduto. Nessa etapa da técnica, devem ser adotadas as seguintes providências:

- anestesia da fêmea receptora (preferencialmente híbrida) previamente acasalada com o macho vasectomizado;
- incisão para a exposição do corno uterino, com posterior apresentação do oviduto;
- ruptura da bolsa ovariana e introdução dos embriões via *infundibulum*;
- retorno do corno uterino e do oviduto à cavidade peritoneal;
- suturas no peritônio e pele;
- acompanhamento pós-cirúrgico e posterior detecção de prenhez.

OBS.: Os processos anteriormente citados fazem parte de um protocolo que deve ser fielmente seguido, sob pena de não se evitar fatores de interferência, que podem comprometer a eficácia da técnica.

O DETALHAMENTO DAS ETAPAS UTILIZANDO COMO EXEMPLO O CAMUNDONGO

PREPARO DE MACHOS VASECTOMIZADOS

Para descrever o processo de vasectomia, inicialmente devemos apresentar os materiais utilizados. Empregaremos o camundongo como modelo.

- INSTRUMENTAL CIRÚRGICO – composto de tesoura de ponta romba, tesoura de ponta fina, pinças relojoeiro e de ponta romba, bisturi, tesouras porta-agulha, agulhas para sutura, linha de algodão para sutura, linha absorvível para sutura do peritônio, agulhas e seringas para anestesia;
- SUBSTÂNCIA ANESTÉSICA – pode variar de acordo com a espécie animal com a qual se está trabalhando. Para camundongos, utiliza-se preferencialmente o *Avertin* (2-2-2-tribromocianol diluído em álcool amyl terciário);
- MATERIAL PARA CAUTERIZAÇÃO DO DEFERENTE – composto por uma pinça relojoeiro e uma lâmparina;
- MATERIAL PÓS-OPERATÓRIO – consiste de uma fonte de calor (podendo ser uma lâmpada incandescente) e de uma caixa individual, para o animal, com comida e água. A cama utilizada deverá ser de papel ou material similar para o aumentar o conforto do animal e reduzir o estresse pós-cirúrgico.

Desse modo, munido-se do material acima citado, pode-se partir para a cirurgia. Inicialmente, administra-se o anestésico no animal via intraperitônio, a fim de sedá-lo. Faz-se então uma incisão no abdômen, a aproximadamente 1 cm acima do pênis. Utilizando as pinças de ponta romba, resgata-se o ducto deferente e, com a pinça relojoeiro, previamente aquecida, procede-se com a cauterização. O testículo é então forçado a retornar à posição anatômica, fazendo-se uma pequena pressão com os dedos indicadores sobre o abdômen, de forma a permitir que o testículo retorne à bolsa escrotal. O mesmo procedimento é utilizado no outro deferente. Finalmente, sutura-se o peritônio e a pele, e o animal é transferido para uma gaiola próxima a uma fonte de calor. O camundongo é então acompanhado em seu pós-operatório pelo período mínimo de dois dias (Fig. 7).

Figura 7 – Desenho esquemático da cauterização do deferente



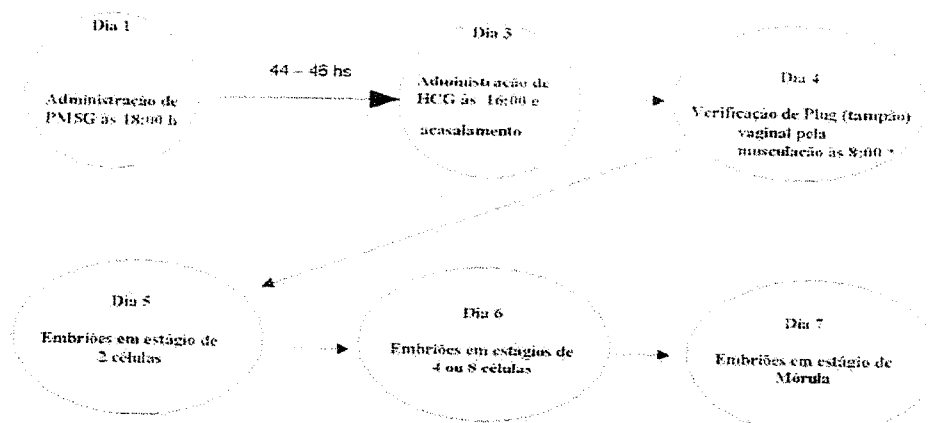
PREPARO DA FÊMEA DOADORA

A fêmea doadora de embriões geralmente é oriunda das colônias de fundação e por esta razão apresenta um custo elevado. A otimização de seu acasalamento é, portanto, bastante desejável. Para atingir um grau máximo de aproveitamento reprodutivo, são utilizados hormônios sexuais que induzem a fêmea a um ciclo exógeno.

Sob o efeito dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), um número bastante elevado de óvulos é produzido e liberado para estarem disponíveis à fecundação. Normalmente, a dose de 5 UI é suficiente para a produção de um elevado número de embriões. Entretanto, em virtude da constituição genética do camundongo (linhagem), certos ajustes se fazem necessários.

Essa etapa do processo (estimulação da fêmea via hormônios), também chamada superovulação, é apresentada na figura seguinte.

Figura 8 – Etapas do processo de superovulação



(*) No caso de ratos, a confirmação da cópula se dá pela procura de espermatozoides em lavagem da vagina da fêmea com solução PBS e observação em microscópio.

COLETA DE EMBRIÕES

Após o processo de superovulação, a fêmea é colocada na presença do macho para que a cópula se processe e os embriões possam ser coletados. Diferentes estágios de desenvolvimento embrionário podem ser utilizados. Porém, os mais utilizados, tanto para congelamento quanto para o implante, são os embriões de 2 a 8 células. Esses estágios são conhecidos como pré-implantação e estão ainda no interior do oviduto, migrando em direção ao útero onde a gestação se desenvolveria (Figs. 9 e 10).

Figura 9 – Estágios de pré-implantação na embriogênese de camundongo

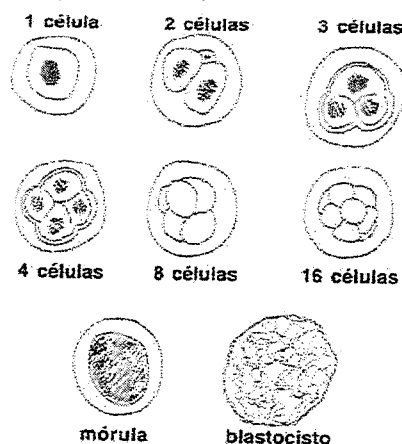
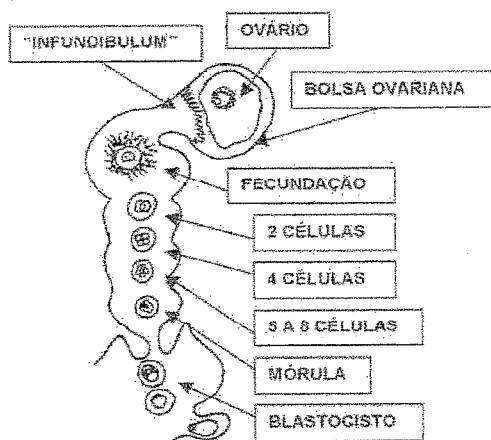


Figura 10 – Estágios de desenvolvimento de embriões no oviduto



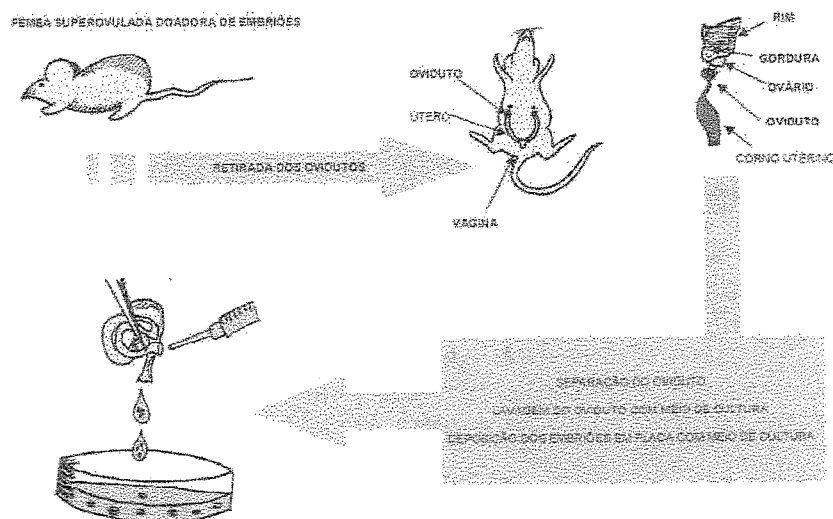
Para a coleta dos embriões presentes no interior do oviduto, são necessários os seguintes materiais:

- INSTRUMENTAL CIRÚRGICO – tesouras ponta romba e ponta fina, pinças ponta romba e reljoeiro; seringa e agulhas especiais para a lavagem do oviduto a partir do infundíbulo com injeção de meio de cultura;
- INSTRUMENTAL DE COLETA – capilares de manipulação, placas de Petri estéreis, meio de coleta.

A técnica de coleta (Fig. 11) acontece como se segue:

- sacrifício da fêmea normalmente executado por deslocamento cervical, uma vez que esse método é rápido e indolor, além de não causar maiores danos aos embriões. Certas drogas, uma vez presentes na circulação, podem atravessar a barreira placentária e causar danos aos embriões, comprometendo a sua viabilidade;
- abertura da pele e do peritônio para o resgate dos cornos uterinos, em cuja extremidade se encontra o oviduto;
- retirada do oviduto com um tesoura de ponta fina;
- lavagem do oviduto com o meio de coleta.

Figura 11 – Diagrama esquemático das etapas de coleta



Terminado o processo acima descrito, os embriões coletados são avaliados quanto às suas características morfológicas e separados para um dos três procedimentos: transferência a fresco, congelamento e cultivo de embriões.

TRANSFERÊNCIA A FRESCO

É a técnica recomendada para substituir a histerectomia tanto para a obtenção de animais axênicos quanto para a descontaminação de colônias comprometidas.

Em ambos os casos, os embriões coletados são transferidos para diferentes placas com meio de coleta. Essa transferência é seriada, constituindo-se de passagens sucessivas de uma placa a outra. A técnica permite que a superfície do embrião (zona pelúcida), seja 'lavada', retirando-se, por 'arraste mecânico', patógenos que estejam em sua superfície. Após a terceira passagem, e uma vez 'limpos', os mesmos são recolhidos e implantados em fêmeas receptoras isentas de patógenos.

CULTIVO DE EMBRIÕES

O cultivo é feito por meio da seleção de embriões e da sua posterior transferência para uma placa contendo meio apropriado. A placa com os embriões é colocada em uma estufa de CO₂ com os seguintes parâmetros de ambiente:

- 4% a 5% de CO₂
- temperatura de 37 °C
- umidade relativa de 90%

Os embriões serão observados por um período de 12 a 14 horas para que seu desenvolvimento possa ser acompanhado. Desse modo, pode-se obter a certificação das rotinas adotadas, da qualidade dos meios de cultura etc. Pode-se também fazer análises dos ajustes na técnica de acordo com as exigências das diferentes linhagens.

Um dos maiores indicadores da eficiência da rotina utilizada é a porcentagem de embriões que conseguem se desenvolver. Entretanto, para essa análise, devem ser utilizados embriões de 2 ou 4 células, preferencialmente oriundos de linhagens, cujos resultados anteriores sejam bem estabelecidos e sirvam como controle.

CONGELAMENTO DE EMBRIÕES (Fig. 12)

Os embriões coletados são submetidos ao processo de congelamento para que possam ser estocados em botijões com nitrogênio líquido (contêineres), constituindo assim o banco de embriões. Como já foi discutido, os representantes das linhagens estarão com sua condição original preservada, ou seja, livres de patógenos, contaminações ou de deriva genética. Em condições normais de estocagem, o nitrogênio líquido do botijão atinge uma temperatura de -196 °C. Nessa temperatura, qualquer atividade metabólica do embrião ou de eventuais patógenos é cessada, fazendo com que o banco seja o local mais seguro para a proteção das linhagens.

Para que o congelamento de embriões seja bem-sucedido, é necessário que o meio utilizado os desidrate gradualmente, evitando que a água em seu interior se cristalice (devido às suas pontes de hidrogênio), o que poderia causar a ruptura da zona pelúcida e, conseqüentemente, sua morte. Assim sendo, no processo de congelamento, o embrião é colocado em um meio levemente hipertônico, o qual promoverá uma retirada parcial da água de seu interior em decorrência da diferença no potencial osmótico (a membrana é semipermeável) entre o meio intra e extracelular. A substância adicionada ao meio de cultura do embrião para que esse fenômeno ocorra é chamada de substância crioprotetora.

Diferentes substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas, dependendo da espécie animal com que se está trabalhando. Para embriões bovinos, por exemplo, o crioprotetor ideal é o glicerol. Já para embriões humanos e de camundongos, o mais utilizado é o propileno glicol.

Há, basicamente, duas metodologias de congelamento. A primeira delas compreende o congelamento rápido com a colocação dos minitubos nos quais os embriões estão acondicionados em contato direto com o nitrogênio líquido. Esse processo é conhecido como 'vitrificação'. Porém, apesar de apresentar bons resultados no caso de embriões bovinos, a vitrificação pode causar danos a embriões cujas características lícias conferem uma menor resistência (em murinos, por exemplo). Assim, pode-se utilizar uma segunda metodologia, conhecida como 'congelamento gradual', que proporcionará melhores resultados.

No congelamento gradual, também conhecido como por etapas, embriões cuja zona pelúcida é menos resistente terão tempo de perder temperatura sem que ocorra uma ruptura de sua cápsula. Na verdade, no processo gradual, ocorre a perda de água por parte do embrião juntamente com o decréscimo de sua temperatura. Uma vez coletados os embriões, o material necessário para o congelamento gradual é o seguinte:

- MATERIAL DE MANIPULAÇÃO – consiste de capilares de manipulação de embriões (confeccionados por meio do alongamento de pipetas Pasteur previamente aquecidas, de modo a formar um capilar de vidro com diâmetro aproximado de 120 micrômetros), placas de Petri (plásticas descartáveis);
- MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO – minitubos próprios para guardar os embriões, botijão com nitrogênio líquido, magazines para o armazenamento de minitubos no interior do botijão;
- MATERIAL QUÍMICO – solução crioprotetora (de concentração conhecida) adequada à espécie utilizada;
- MATERIAL DE CONGELAMENTO – banho refrigerado com controle de temperatura. Os banhos devem ser programáveis e permitir um decréscimo controlado.

O processo de congelamento em etapas (Gráfico 1) inicia-se com a adição da solução crioprotetora ao meio e este ao minitubo. A partir daí, os embriões são retirados da placa contendo meio de cultura e, com o auxílio de um capilar, colocados no interior do minitubo. Este, então, é levado ao banho refrigerado que executará a diminuição gradual da temperatura. Logo, o minitubo estará congelado e poderá então ser colocado no reservatório de nitrogênio líquido, onde poderá ser mantido por tempo indeterminado, desde que o nível de nitrogênio seja periodicamente acompanhado e completado quando necessário.

Gráfico 1 – Temperatura em razão do tempo no congelamento gradual

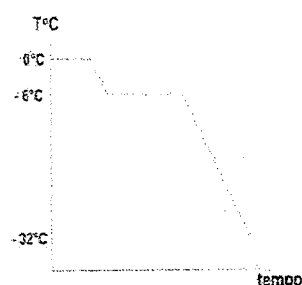
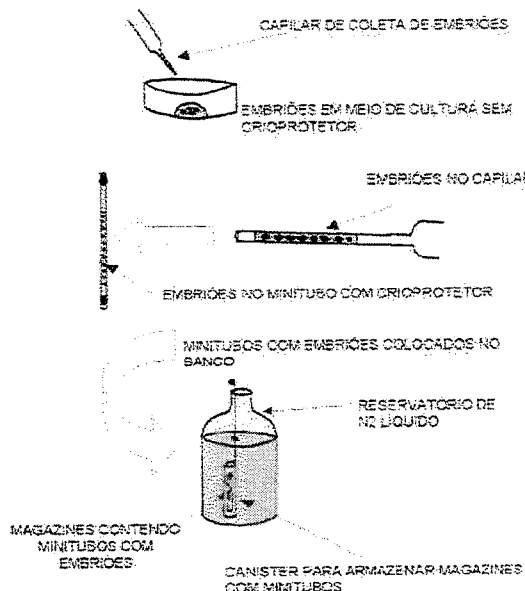


Figura 12 – Esquema da rotina de congelamento de embriões realizada em crioconservação para a formação do banco de embriões



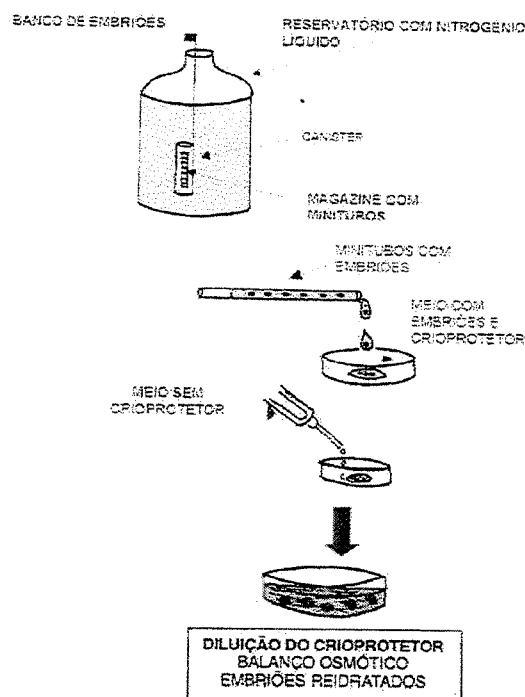
DESCONGELAMENTO DE EMBRIÕES

O processo de descongelamento deve ser realizado com cuidado, para não danificar os embriões. O crioprotetor deve ser retirado para que o embrião seja hidratado novamente. Porém, essa reidratação deve acontecer também de uma forma gradual, com o intuito de se evitar que o embrião absorva água em excesso e se rompa.

Para tanto, retira-se o minitubo do reservatório de nitrogênio líquido, esperando até seu descongelamento total (pode-se utilizar uma simples fricção manual para acelerar o processo). Coloca-se o conteúdo do minitubo em uma placa esteril. Finalmente, inicia-se a diluição do crioprotetor em meio de cultura para a restauração do potencial osmótico original do embrião (Fig. 13).

Executado o descongelamento, os embriões poderão ser cultivados ou diretamente implantados em fêmeas receptoras programadas, como será descrito a seguir.

Figura 13 – Procedimento para descongelamento de embriões



IMPLANTE DE EMBRIÕES

Uma das possibilidades de utilização dos embriões descongelados é o implante. Por meio dele, uma fêmea receptora pseudoprenhe recebe embriões de uma doadora.

A pseudoprenhez é alcançada com a colocação da fêmea receptora para que acasale com um macho vasectomizado, conforme já descrito acima. Esse procedimento promove alterações fisiológicas que aumentam o sucesso da técnica.

O implante é um processo cirúrgico bastante delicado e exige os seguintes materiais:

MATERIAL CIRÚRGICO – pinças relojoeiro e de ponta romba, tesouras de pontas romba e fina, tesoura porta-agulha, agulha para sutura, linha de algodão para sutura da pele, bisturi, agulha e seringa para administração de anestésico, gaze e filtros de papel;

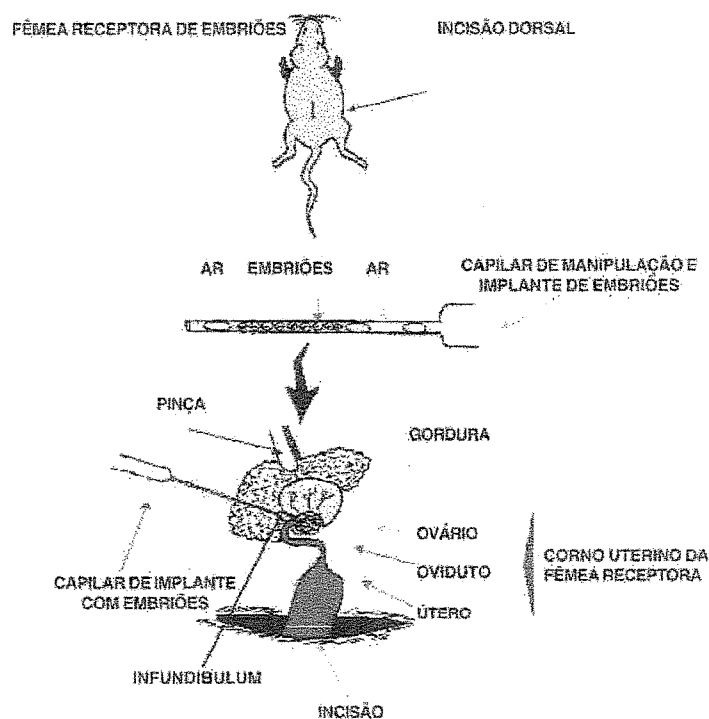
- SUBSTÂNCIA ANESTÉSICA – preferencialmente deve-se utilizar para camundongos o 2-2-2-tribromocetanol (Avertin) diluído em álcool isoamílico terciário, injetado intraperitonalmente;
- MATERIAL PARA MANIPULAÇÃO E IMPLANTE DE EMBRIÕES – placas de Petri plásticas estéreis e descartáveis, capilar de implante (que deve ser mais curto e delgado do que o utilizado para a manipulação);
- MATERIAL POS-OPERATÓRIO – fonte de calor (lâmpada incandescente) para o pós-operatório. Acompanhamento da prenhez.

Para a execução do implante (Fig. 14), anestesia-se a fêmea e, então, se faz uma pequena incisão dorsal na altura correspondente aos rins. Utilizando a pinça de ponta romba, após a abertura do peritônio, resgata-se o oviduto, puxando-o pela gordura adjacente. Com as pinças relajoetro, rompe-se cuidadosamente a bolsa ovariana, expondo o ovário e o infundíbulo. Introduz-se o capilar de implante no início do oviduto (infundíbulo), e se injeta os embriões. Após a devolução da estrutura à sua posição anatômica inicial, a pele deve então ser suturada. O animal é mantido sob observação em separado de outros para a detecção da prenhez.

A técnica do implante precisa é o passo final para o repovoamento de uma colônia de animais que tenha sido exterminada ou contaminada por um patógeno qualquer. Assim, os embriões a serem implantados devem, antes, passar por um processo de análise e seleção, de modo a diminuir insucessos.

Além disso, deve-se observar se o embrião a ser implantado apresenta características condizentes com seu estágio de desenvolvimento. A aparência da zona pelúcida, a posição e o tamanho dos blastômeros e a presença ou não de atividade celular são excelentes indicadores de qualidade embrionária.

Figura 14 – O procedimento de implante de embriões em camundongos



PRINCIPAIS FATORES LIMITANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO

Por se tratar de um processo que exige precisão e delicadeza, a criopreservação de embriões está sujeita a fatores de interferência. Os mais importantes são:

- **QUALIDADE DOS MEIOS UTILIZADOS** – deve-se ter um forte controle sobre os meios de cultura e coleta. Assim, a qualidade dos reagentes utilizados é determinante para o sucesso de qualquer técnica que envolva a manipulação direta de embriões. É necessário também um conhecimento das características químicas e biológicas dos meios (pH, osmolaridade, temperatura de acondicionamento etc.);
- **ESTOCAGEM** – os meios devem ser preferencialmente recém-preparados. Nos casos em que isso não é possível, os mesmos deverão ser conservados em *freezer* e em frascos estéreis. Entretanto, sempre se deve considerar a sua 'idade' como um fator de interferência;
- **ADEQUAÇÃO DO MEIO** – o meio de cultura deve ser adequado a espécie de embriões a serem cultivados, bem como ao seu estágio de desenvolvimento. Quando não há conhecimento prévio da eficácia do meio, recomenda-se a execução de ensaios e testes;
- **IDADE DAS FÊMEAS** – fêmeas doadoras e receptoras podem ser utilizadas em diferentes idades, dependendo da linhagem ou espécie. Deve-se, porém, ter um conhecimento da fisiologia do animal com que se está trabalhando para adequar a idade à sua utilização;
- **CONDIÇÕES DE SUPEROVULAÇÃO** – fatores como peso e estresse devem ser considerados no momento da superovulação. A superovulação é uma etapa muito crítica para o sucesso da técnica. Sua resposta é diferente entre espécies e muitas vezes dentro da mesma espécie. Como exemplo destacamos a variação no número de embriões, observada entre camundongos isogênicos, porém de linhagens diferentes;
- **ESCOLHA DO CRIOPROTETOR** – como já foi dito anteriormente, diferentes espécies respondem de maneiras particulares à ação de um determinado crioprotetor. Cuidados devem ser tomados e protocolos já existentes devem ser consultados;
- **METODOLOGIA** – tanto no congelamento quanto no descongelamento, a metodologia aplicada é fundamental para a determinação da viabilidade embrionária. Alguns embriões respondem melhor a certas técnicas de congelamento que outros. Assim sendo, deve-se pesquisar em bibliografias adequadas qual é a melhor metodologia a ser aplicada à espécie que se deseja criopreservar;
- **VIA DE IMPLANTAÇÃO** – o embrião tem um caminho natural no interior do trato reprodutivo da fêmea. Assim, o local onde o mesmo será implantado dependerá de seu estágio de desenvolvimento. As duas possibilidades são: implante no oviduto ou diretamente no útero;
- **FÊMEAS RECEPTORAS** – algumas linhagens respondem melhor ao implante de embriões do que outras. Logo, a seleção das linhagens mais propícias a receber embriões é desejável. Via de regra, a utilização de fêmeas híbridas reduz a interferência do *background* genético, aumentando sensivelmente o número de sucessos.

A MANIPULAÇÃO DE EMBRIÕES E O FUTURO

O futuro da manipulação de embriões é bastante promissor, em todos os aspectos. Por se tratar de um ramo da ciência em pleno desenvolvimento, novas tecnologias vão surgindo a cada dia, e com elas surgem também novas perguntas que exigem respostas.

Aualmente, a manipulação de embriões está amplamente difundida em diversos ramos da economia, como a pecuária, a indústria farmacêutica e nas clínicas de reprodução humana. Com o advento de novas descobertas e tecnologias, a tendência de uma maior propagação e utilização dos processos de criopreservação e de manipulação embrionária é inegável. Ainda assim, há muito o que ser descoberto na área.

A utilização de embriões para a criação de modelos experimentais transgênicos ganha força a cada dia, sendo que o mesmo pode-se dizer no que tange aos processos de clonagem, fertilização etc. Deste modo, o futuro reserva muitos avanços aos bioteristas que escolhem esta área. Porém, deve-se possuir a ética e o discernimento necessários a fim de julgar o impacto das descobertas vindouras para a humanidade.

A ciência é a ferramenta maior de avanços para o ser humano. É a maior geradora de conhecimento de nossa civilização. Porém, esta mesma ciência que salva também pode ser usada para destruir. Será que todos aqueles que estudaram as propriedades do átomo imaginavam que um dia esse conhecimento seria utilizado para a destruição em massa de seres humanos? Daí a necessidade de um julgamento lúcido e ético acerca das necessidades de nosso mundo.

A manipulação de embriões pode ser utilizada um dia para salvar espécies ameaçadas de extinção, para a multiplicação de rebanhos a fim de suprir o crescente aumento populacional e até mesmo para curar doenças. Porém, é necessário ética. Caso contrário, podemos correr o risco de novamente a ciência criar algo do qual posteriormente se arrependerá.

BIBLIOGRAFIA

- DE LUCA, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicas em Bioterismo*. 2ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.
- GREEN, M. *Genetic Variants and Strains of The Laboratory Mouse*. Stuttgart/New York: Ed. Gustav Fischer Verlag, 1979.
- HAFEZ E. S. E. *Reprodução Animal*. Michigan: Manole Ltda., 1982, v. I e II.
- HEDRICH, H. J. & REETZ, I. C. Cryopreservation of rat embryos. In: *Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats*. Stuttgart/New York: Ed. Gustav Fischer Verlag, 1990.
- HOGAN, B. et al. *Manipulating the Mouse Embryo – a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- KAWASE, Y. et al. Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryo stem cells into mouse blastocysts. *Contemporary Topics*, 40(2), 2001.
- NAKAGATA, N. Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Experimental Animal*, 44(1):1-8, 1995.
- REETZ, C. et al. Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo transfer. *Laboratory Animal Science*, 38(6):696-701, 1988.
- SILVER, L. M. *Mouse Genetics – concepts and applications*. New York: Oxford University Press, 1995.
- SZTEIN, J. M. et al. Mouse sperm cryopreservation protocol. *Cryobiology*, 35:46-52, 1997.
- UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE (UFAW). *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1986.
- WOO, M. *Practical Notes on Oocytes Embryo – recovery culture, transfer, fertilization in vitro and storage*. MRC Experimental Embryology and Teratology Unit, St. George's Hospital Medical School, London, England, s.d.

Anexo IV: Protocolo Experimental 428-1- CEEA- Comissão de Ética em Experimentação Animal



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 428-1 sobre "Amplificação das
celulas NATURAL KILLER (NK) NA CAPTOPRODINASE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDUGOS"
sob a responsabilidade de DELMA REGINA ALVES

está de acordo
com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de
Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na
Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05.1.2002

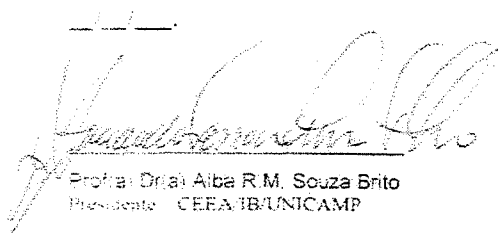
Campinas, 05 de Julho de 2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº ".....", entitled "....."

is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian
College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional
Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on

Campinas 05 de Julho de 2002.


Prof.ª Dra.ª Alba R.M. Souza Brito
Presidente CEEA-IB/UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA DE CAMPINAS
RUA DA FLORESTA, 34
13081-970 CAMPINAS, SP, BRASIL

TELEFONE (019) 788 7126
FAX (019) 289 3124