

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

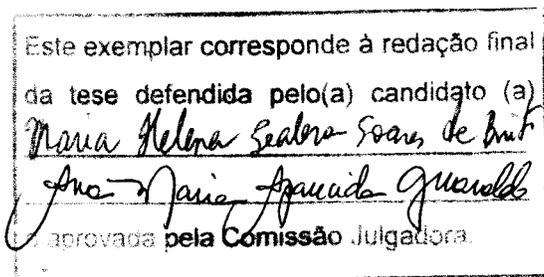
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**MARIA HELENA SEABRA SOARES DE BRITTO**

**“Manutenção em linhagens de camundongos e infecção *in vitro* de  
uma cepa de *Cryptosporidium* sp de origem humana”**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Campinas, SP  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**B778m** Britto, Maria Helena Seabra Soares de  
Manutenção em linhagens de camundongos e infecção  
*in vitro* de uma cepa de *Cryptosporidium* sp. de origem  
humana / Maria Helena Seabra Soares de Britto. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. *Cryptosporidium*. 2. Camundongo. 3. Cultura *in vitro*.  
I. Guaraldo, Ana Maria Aparecida. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** *Cryptosporidium* sp. MMC/Uni human strain: maintenance in mice and in MDBK cells.

**Palavras-chave em inglês:** Cryptosporidium; Mice; In vitro cultivation.

**Titulação:** Doutora em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Ana Maria Aparecida Guaraldo, Othon de Carvalho Bastos, Regina Maura Bueno Franco, Maria Silvia Viccari Gatti, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.

**Data da defesa:** 05/09/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

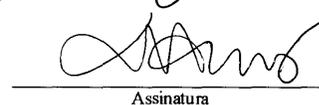
Campinas, 05 de setembro de 2007.

### BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

  
Assinatura

Profa. Dra. Delma Pegolo Alves

  
Assinatura

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

  
Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

  
Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Urara Kawazoe

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Othon de Carvalho Bastos

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **CÂNTICO DAS CRIATURAS**

*"Louvado sejas nas criaturas,  
Primeiro o sol lá nas alturas,  
Clareia o dia, grande esplendor,  
Radiante imagem de ti, Senhor.*

*Louvado sejas pela irmã lua,  
No céu criaste, é obra tua,  
Pelas estrelas claras e belas,  
Tu és a fonte do brilho delas.*

*Louvado sejas pelo irmão vento  
E pelas nuvens, o ar e o tempo,  
E pela chuva que cai no chão,  
Nos dás sustento, Deus da criação.*

*Louvado sejas meu bom Senhor,  
Pela irmã água e seu valor,  
Preciosa e casta, humilde e boa,  
Se corre, um canto a ti entoa.*

*Louvado sejas, oh meu Senhor,  
Pelo irmão fogo e seu calor,  
Clareia a noite, robusto e forte,  
Belo e alegre, bendita sorte.*

*Sejas louvado pela irmã Terra,  
Mãe que sustenta e nos governa,  
Produz os frutos, nos dá o pão,  
Com flores e ervas sorri o chão.*

*Louvado sejas meu bom Senhor,  
Pelas pessoas que em teu amor,  
Perdoam e sofrem tribulação,  
Felicidade, em Ti encontrarão.*

*Louvado sejas pela irmã morte,  
Que vem a todos, ao fraco e ao forte.  
Feliz aquele que te amar,  
A morte eterna não o matará.*

*Bem aventurado quem guarda a paz,  
Pois o Altíssimo o satisfaz.  
Vamos louvar e agradecer  
Com humildade, ao Senhor bendizer."*

**São Francisco de Assis.**

**Aos meus queridos filhos Maria, Tadeu  
e Todos os outros que eles representam.**

## AGRADECIMENTOS:

Quando somos gerados, caminhamos para o nascimento.

Graças à Deus.

Depois que nascemos, iniciamos nossa caminhada para a vida:

Os primeiros passos para o cuidado de nós mesmos.

Graças aos pais.

Seguimos caminhando para a vida em sociedade: aprendemos a nos posicionar.

Graças aos irmãos, aos parentes e aos amigos.

Continuamos nossa caminhada, desta vez rumo ao conhecimento: aprendemos a ler, a escrever, a ver o mundo e a compreender os fenômenos da vida.

Graças aos queridos mestres.

Finalmente caminhamos ao encontro do que nos fará felizes: nossas carreiras, nosso espaço e os nossos companheiros (não necessariamente nesta ordem).

Graças aos filhos.

Agradeço, pois, a todos os que caminharam e estão caminhando comigo, desde aqueles que me serviram de muleta, ou me carregaram nos braços, até aqueles que me deram empurrões, ou tentaram derrubar-me, pois mesmo assim impulsionaram-me para frente.

A vida é um eterno caminhar.

Muito obrigada!

Nesta mesma oportunidade, necessária se faz a nomeação de algumas pessoas e em seguida, de algumas instituições, obedecendo-se à ordem alfabética, cujos papéis foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho:

Ana Lucia Rodrigues da Soledade  
 Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo  
 Prof. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo  
 Dra. Delma Pegolo Alves  
 Francine Aparecida Guaraldo de Andrade  
 Francisco de Assis da Silva  
 José Raimundo dos Reis  
 José Sérgio dos Santos  
**Marcos Mendes Costa**  
 Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti  
 Nilson Branco  
 Prof. Dr. Othon de Carvalho Bastos  
 Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco  
 Dr. Rovilson Gilioli  
 Prof. Dr. Tomomasa Yano  
 Profa. Dra. Urara Kawazoe  
 Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

CAPES

CEMIB

Fundação Nacional de Saúde  
 Universidade Estadual de Campinas  
 Universidade Federal do Maranhão

## RESUMO

O gênero *Cryptosporidium* compreende atualmente 16 espécies, que já foram encontradas parasitando mais de 150 espécies animais, incluindo o homem, no qual já foram referidas infecções causadas por sete delas. O *Cryptosporidium parvum* é o mais estudado porque é responsabilizado pelo caráter zoonótico da infecção. A espécie responsável pelo caráter antroponótico da criptosporidiose é o *Cryptosporidium hominis*. Embora já tenha sido descoberto há cem anos e mesmo com o avanço da genômica e biologia molecular, ainda existem muitas dúvidas sobre sua taxonomia, biologia e relação com seus variados hospedeiros. Dados na literatura apontam para a necessidade urgente da definição de modelos experimentais para cultivo de linhagens do parasito “*in vivo*” e “*in vitro*”. As pesquisas “*in vivo*” esbarram na dificuldade da utilização de grande número de animais certificados do ponto de vista genético e sanitário e mantidos em ambientes controlados. Por outro lado, os métodos de cultivo “*in vitro*” têm-se mostrado de difícil reprodutibilidade, pois a grande variabilidade de linhagens celulares, com diferentes origens, cultivadas em diferentes meios, em condições ambientais diversas, tornam bastante controversos os resultados obtidos nessa área. Neste trabalho apresentamos o cultivo de uma cepa de origem humana de *Cryptosporidium sp*, de um único paciente portador de HIV/aids, com criptosporidiose, denominada de MMC/Uni, mantida pela infecção por tubagem intra-gástrica de  $10^5$  oocistos em camundongos neonatos livres de patógenos específicos (SPF) de linhagens, heterogênicas e isogênicas imunocompetentes e imunodeficientes, mantidos durante todo o experimento em isolador de PVC flexível. Oocistos da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium sp* foram purificados mediante gradiente de sacarose. Após excitação, foram cultivados em monocamadas da linhagem celular MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). A presença de merontes foi constatada após 90 horas de cultivo. A cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium sp*, de origem humana, permaneceu infectante após 16 meses, sob refrigeração a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio a 2,5% e manteve a infectividade de camundongos após 10 meses de congelamento em DMSO a -70°C.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cryptosporidium sp*, cepa de origem humana, cultivo “*in vitro*”, camundongos, células MDBK.

## **ABSTRACT**

*Cryptosporidium* covers actually 16 species, that have been found infecting more than 150 animal species, including humans, in which have already been reported infections caused by seven of them. *Cryptosporidium parvum* is the most studied, due to be responsible by the zoonotic character of the infection. The specie responsible by the anthroponotic character of the criptosporidiosis is *Cryptosporidium hominis*. Although it has been discovered a hundred years ago, and even with the advances in genomics and molecular biology, still persists many doubts about its taxonomy, biology and the relations with its many different hosts. Data in literature point toward the urgent need in the definition of experimental models to cultivate strains of the parasite “*in vivo*” and “*in vitro*”. The research “*in vivo*” faces the difficulty in the use of a great number of certificated animals, in the point of genetic and sanitary view, kept in controlled environment. In the other hand, “*in vitro*” culture methods have shown to be of difficult reproductibility, for the great variability of the cellular strains, with different origins, kept in different breeding media, in diverse environmental conditions, turn out of great controversy the results found in this area. Here we present a strain of *Cryptosporidium* sp, from human origin, taken from an unique HIV/aids patient with criptosporidiosis, named as MMC/Uni, kept by a intragastric tubage infection of  $10^5$  oocysts in Specific Pathogen-Free (SPF) neonates from outbred and inbred immunocompetent or immunodeficient mice strains, kept during the entire experiment in an isolator of flexible PVC. Oocysts of MMC/Uni strain of *Cryptosporidium* sp were purified by sucrose gradient. After excystation, they were cultivated in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cells monolayers. The presence of meronts was observed after 90 hours of cultivation. The strain MMC/Uni of *Cryptosporidium* sp, from human origin, remained infectant after 16 months, under refrigeration at 4°C, in a 2.5% solution of Potassium Dichromate, and maintained infectiveness in mouse, after 10 months of freezing in DMSO at -70°C.

**KEY WORDS:** *Cryptosporidium* sp, strain from human origin, “*in vitro*” culture, mouse strains, MDBK cells.

## LISTA DE APÊNDICES

**APÊNDICE I:** Artigo publicado em co-autoria, intitulado: “Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes”

**APÊNDICE II:** Capítulo de livro, escrito em conjunto, intitulado: “Cultivo celular de *Cryptosporidium spp*”.

## LISTA DE ANEXOS

**ANEXO I:** Manutenção do cultivo *in vivo* do *Cryptosporidium* sp

**ANEXO II:** Composição do MEM-EAGLE

**ANEXO III:** Documento de aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal,  
Protocolo nº 1304-1

## SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Apêndices.....	ix
Lista de Anexos.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1 CRIPTOSPORIDIOSE EXPERIMENTAL .....	13
2. OBJETIVOS .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 OBTENÇÃO DO <i>Cryptosporidium</i> sp .....	21
3.2 PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	21
3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	22
3.4 INFECÇÃO <i>in vivo</i> .....	23
3.4.1 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS NEONATOS SPF COM A CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	23
3.4.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	25
3.5 INFECÇÃO <i>in vitro</i> .....	26
3.5.1 EXCISTAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	26
3.5.2 CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM MDDK .....	27
3.5.3 CULTIVO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp EM CÉLULAS MDBK .....	28
3.6 CRIOPRESERVAÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	29
3.7 TESTES DE INFECTIVIDADE DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	29
4. RESULTADOS .....	31
4.1 OBTENÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp .....	31
4.2 MANUTENÇÃO <i>in vivo</i> DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp, EM CAMUNDONGOS .....	33
4.3 MANUTENÇÃO <i>in vitro</i> DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE <i>Cryptosporidium</i> sp, EM CÉLULAS MDBK .....	38
4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> sp, MMC/Uni .....	41
5. DISCUSSÃO .....	42
6. CONCLUSÕES .....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
Apêndice I: Artigo publicado em co-autoria, intitulado: “Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes.....	84
Apêndice II: Capítulo de livro, intitulado: “Cultivo celular de <i>Cryptosporidium spp</i> ”.....	90
Anexo I: Manutenção do cultivo <i>in vivo</i> do <i>Cryptosporidium</i> sp .....	115
Anexo II: Composição do MEM-EAGLE .....	116
Anexo III: Documento de aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal, Protocolo nº 1304-1.....	117

## **1. INTRODUÇÃO:**

*Cryptosporidium parvum* é um parasito do filo Apicomplexa. Este filo constitui um agrupamento de protozoários bastante homogêneo, com cerca de 4.600 espécies descritas (LEVINE, 1988), sendo todas parasitas. São também conhecidos como coccídios, com a principal característica de possuírem na extremidade anterior de suas formas infectantes um complexo de organelas destinadas à sua penetração nas células do hospedeiro, conhecido pelo nome de complexo apical. O *C. parvum* pertence à Classe Sporozoasida, pois seus oocistos, após excitação, liberam quatro esporozoítos infectivos e porque sua reprodução é tanto assexuada, quanto sexuada; Sub-Classe Coccidiasina, seu ciclo biológico consiste de merogonia, gametogonia e esporogonia; Ordem Eucoccidiorida, ocorre esquizogonia; Sub-Ordem Eimeriorina, macro e microgametas desenvolvendo-se independentemente; e, Família Cryptosporidiidae, porque seus oocistos não contêm esporocistos, mas sim, quatro esporozoítos livres (LEVINE, 1988; TZIPORI, 1998 e TZIPORI & WARD, 2002). Convém ressaltar que após quase 100 anos da descoberta deste parasito e mesmo com os avanços das técnicas de genética e biologia molecular, ainda existem controvérsias quanto à sua taxonomia (CACCIÒ et al, 2005).

O gênero *Cryptosporidium* foi inicialmente reconhecido por Ernest Edward Tyzzer, que o descreveu, em 1907, nas glândulas gástricas de camundongo, dando a esta espécie a denominação de *Cryptosporidium muris*. Mais tarde, em 1912, este mesmo autor isolou do intestino delgado, também de camundongo, uma outra espécie, *Cryptosporidium parvum*, que, ao contrário do inicialmente descrito, não infecta o estômago e seus oocistos são menores.

A palavra “*cryptosporidium*” pode ser traduzida como “esporo escondido”, ou mais especificamente do latim, como “esporo de debaixo da terra”, Tyzzer (1910) tinha a intenção ao nomear este gênero, de defini-lo como um “sporozoon” no qual os esporos são indistinguíveis, ou ausentes nos seus oocistos. Nesse mesmo artigo, o autor diferenciava o gênero *Cryptosporidium* dos coccídios, em razão de suas estruturas distintas: os coccídios têm geralmente esporozoítos no interior dos esporocistos, os quais estão ausentes no gênero por ele descrito.

Embora já descrito desde o início do século passado, pensava-se que se tratava de um parasito bastante raro, não patogênico e hospedeiro-específico. Alguns estudos realizados há algumas décadas documentaram sua ocorrência no gado. Mesmo demonstrando ser de grande interesse para as ciências veterinárias, foi somente no início da década de 80, depois de ser reconhecido como causa relevante de mortalidade e morbidade para os pacientes imunossuprimidos, principalmente aqueles acometidos pela Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (Aids), é que surgiram algumas importantes informações sobre a biologia, patogenia e epidemiologia desta zoonose, embora alguns desses aspectos ainda mereçam estudos minuciosos (TZIPORI, 1983 e TZIPORI & WARD, 2002).

Atualmente existem reconhecidas neste gênero, 16 espécies: *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium meleagridis* e *Cryptosporidium galli* (aves); *Cryptosporidium molnari* e *Cryptosporidium scophitalmi* (peixes); *Cryptosporidium serpentis* e *Cryptosporidium saurophilum* (répteis); *Cryptosporidium wrairi* (cobaias); *Cryptosporidium felis* (gatos); *Cryptosporidium canis* (cães); *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium bovis* (gado bovino); *Cryptosporidium suis* (suíno); *Cryptosporidium muris*, encontrado preferencialmente nos camundongos; *Cryptosporidium parvum*, capaz de infectar aproximadamente 155 espécies de mamíferos, inclusive o homem; e, *Cryptosporidium hominis*, encontrado quase que exclusivamente em humanos (MORGAN-RYAN et al., 2002; CAREY et al., 2004; XIAO et al., 2004; RYAN et al., 2004; FAYER, 2005; FAYER et al., 2005 e SUNNOTEL et al., 2006). Mais recentemente SLAPETA (2006) propôs a descoberta de uma nova espécie, o *Cryptosporidium pestis*, também em bovinos; porém, esta nova espécie está ainda para ser validada (SLAPETA, 2007 e XIAO, 2007).

Entretanto, face à identificação de muitas espécies de *Cryptosporidium* terem sido realizadas apenas pela morfologia de seus oocistos, sem dados suficientes relacionados com a especificidade dos seus hospedeiros, ou do estudo esmiuçado de suas características moleculares, ainda não se sabe exatamente o número de isolados que são realmente da espécie *C. parvum* (FAYER, 2005).

Por outro lado, vários estudos realizados com diferentes isolados de *C. parvum*, permitiram originalmente sua classificação em dois grandes grupos que infectam

humanos: a linhagem antroponótica, que parecia ser infectante apenas para humanos, genótipo 1 e a linhagem zoonótica, capaz de infectar também outras espécies de mamíferos, além do homem, genótipo 2 (PENG et al., 1997).

*C. parvum* genótipo 1 ou “H” (humano) é que foi nomeado *C. hominis* e já foi registrado em mamífero marinho (*Dungong dugon*) e ovinos, onde também já foram referidas infecções experimentais, além de leitões (XIAO et al., 2004). *C. parvum*, genótipo 2 ou “C” (bovino), tradicionalmente infecta o trato gastrointestinal tanto de seres humanos como de muitas outras espécies animais (CARRAWAY et al., 1997), o qual foi recentemente nomeado como *Cryptosporidium pestis* (SLAPETA, 2006).

O gênero *Cryptosporidium* tem um ciclo biológico, apesar de complexo, semelhante ao dos coccídios em geral, apresentando algumas particularidades. É monoxênico e obrigatoriamente intracelular em todas as etapas. Sua reprodução pode ser tanto assexuada, quando ocorrem duas gerações de merontes (merontes Tipo I e merontes Tipo II), como sexuada, com formação de macrogametas e microgametas. Após a fecundação há a formação dos oocistos (que por não conterem esporocistos, apresentam 4 esporozoítos livres em seu interior), compreendendo os produtos finais, que são liberados junto com as fezes para o meio ambiente, já aptos para promoverem infecção (FLANIGAN & SOAVE, 1993). Nesse processo são conhecidos seis estágios distintos (KEUSCH, et al., 1995), a seguir:

1. Excitação, quando nos hospedeiros suscetíveis, após a ingestão dos oocistos, havendo mudanças de temperatura e ph, na presença de sais biliares e enzimas pancreáticas, ocorre a liberação dos seus quatro esporozoítos (formas infectantes), através de uma sutura localizada ao longo de um dos lados do oocisto, preferencialmente na região do íleo (CAREY et al., 2006).
2. Merogonia, que constitui a invasão das células epiteliais do intestino delgado, quando cada esporozoíto, após a penetração em uma única célula, diferencia-se em trofozoíta, localizando-se no vacúolo parasitóforo, formado pela fusão das membranas do parasita e da célula do hospedeiro. Nesta fase, quando o núcleo do trofozoíta se divide, dá-se início ao estágio de multiplicação intracelular assexuado (merogonia ou esquizogonia), resultando na formação de merontes ou esquizontes, que recebem o nome de merontes Tipo I, que se rompem, liberando os merozoítas, em número de seis a oito, em cada um.

Uma vez libertos, esses merozoítas penetram em novas células e, por merogonia vão formar outros merontes. Esse ciclo pode continuar ocorrendo indefinidamente. Nessa etapa alguns merontes Tipo I vão originar os merontes Tipo II, os quais contêm apenas quatro merozoítos.

3. Gametogonia (reprodução sexuada), quando ocorre a diferenciação de macrogametas e microgametas . Sabe-se que apenas merozoítos do Tipo II são capazes de iniciá-la. Esses merozoítos do Tipo II penetram em novas células e, quando o fazem, alguns aumentam de tamanho, permanecendo uninucleados e formando os macrogamontes (femininos); outros, tornam-se multinucleados e formam microgamontes, que após divisão nuclear contêm 16 microgametas não flagelados (masculinos), cada um.
4. Fertilização, que ocorre quando os microgametócitos se rompem, liberando os microgametas, que penetram nos macrogametas, formando um zigoto.
5. Desenvolvimento dos oocistos. Após a formação do zigoto (único estágio diplóide em todo o ciclo biológico), inicia-se a formação de uma membrana ao seu redor, na maioria das vezes bastante resistente, designada de “parede espessa”, com cerca de 40 até 100nm, que caracteriza essa nova forma, o oocisto, como a forma de resistência deste parasito. Entretanto, aproximadamente 20% dos oocistos são produzidos sem essa membrana espessa e são denominados de oocistos de “parede delgada”, cuja espessura varia de 3 a 7nm (CURRENT & REESE, 1986 e TZIPORI & WIDMER, 2000).
6. Esporogonia, que é a formação de quatro novos esporozoítos dentro dos oocistos, por divisão meiótica. Por esta razão, esses oocistos já são infectantes, quando liberados para o meio ambiente.

A curiosa presença de oocistos de “parede grossa” e de “parede delgada”, conferem aos protozoários de gênero *Cryptosporidium* a possibilidade de ter três ciclos de infecção distintos: o primeiro, externo, por ingestão de oocistos eliminados no ambiente junto com as fezes, os quais excistam-se no interior do intestino do hospedeiro suscetível, liberando os esporozoítos infectantes; o segundo, interno, quando os oocistos de parede delgada rompem-se ainda no interior do hospedeiro, liberando os esporozoítos infectantes, num processo denominado auto-infecção. Em adição ao processo de auto-infecção, temos o terceiro, anteriormente referido, também interno, originado da contínua replicação dos merontes Tipo I (FAYER, 1997).

A infecção pelo *C. parvum* ocorre nas vilosidades da membrana de enterócitos apicais do intestino delgado, desde o íleo até o colo, mas é capaz de desenvolver-se em qualquer célula epitelial onde haja microvilosidades; por essa razão, infecções em diferentes órgãos e tecidos têm sido referidas na literatura (TZIPORI, 1998). CLAVEL et al. (1996) reportaram o *C. parvum* como causa de infecção no trato respiratório. Nas células do hospedeiro, o parasita aloja-se em uma espécie de vacúolo parasitóforo, por dentro da membrana celular, mas por fora do citoplasma, onde é possível ter acesso às reservas nutricionais da célula e ficar protegido da resposta imune do hospedeiro (FAYER, 1997), devido a este fato é comum afirmar que o *Cryptosporidium* é um parasita intracelular, porém extra-citoplasmático.

O desenvolvimento do *C. parvum* ocorre muito mais rápido do que se supunha e, cada geração se desenvolve e amadurece no período de 12 a 14 horas. Por causa da rapidez do seu ciclo evolutivo, somado aos processos de auto-infecção, um número bem expressivo de organismos pode colonizar o trato intestinal por longos períodos. O íleo rapidamente fica colonizado e sítios secundários, como o duodeno e o intestino grosso tornam-se infectados (TZIPORI, 1998).

O período pré-patente varia de acordo com o hospedeiro e a espécie de *Cryptosporidium*. Experimentalmente, períodos pré-patentes para o *C. parvum* têm variado na proporção de 2-7 dias para bois, 2-4 dias para cães, 3-6 dias para porcos, 2-5 dias para carneiros (FAYER et al, 1990) e 4-22 para os humanos (DU PONT et al., 1995). Entretanto, nas epidemias humanas, quando a infecção provavelmente ocorreu por veiculação hídrica, onde números bastante reduzidos de parasitas são ingeridos, um período pré-patente de 4 a 6 dias é típico (FAYER, 1997). VITOVEC e KOUDELA (1988) observaram também que o período pré-patente varia conforme o número de oocistos inoculados e a idade do modelo animal.

O período patente, que compreende o tempo que dura a eliminação dos oocistos, também é bastante variável e, experimentalmente, está definido de 1-12 dias para bois, 3-33 para cães, 5-14 para porcos (FAYER et al, 1990) e 1-20 dias para humanos (DU PONT, 1995). FAYER et al., (1997), referem para humanos imunocompetentes um período de 6-18 dias para a eliminação de oocistos nas fezes, com 4 a 10 dias de diarreia, prazo

este que é estendido quando se tratam de humanos imunodeficientes. Estes autores relatam que alguns indivíduos podem liberar oocistos e parecerem assintomáticos.

A criptosporidiose foi diagnosticada pela primeira vez em humanos por NIME et al., em 1976. Nesse mesmo ano, MEISEL et al., reportam também um caso de diarreia causada pelo *C. parvum* em paciente imunossuprimido. Nos anos 80, quando apareceram os primeiros casos humanos de HIV/aids, o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), nos Estados Unidos, diagnosticou 21 casos de criptosporidiose nesses pacientes (CDC, 1982). Desde então, o *Cryptosporidium* tem sido reconhecido internacionalmente como agente causador de uma diarreia aquosa, com período de duração variável, que nos indivíduos imunocompetentes apresenta sintomatologia média a moderada, tornando-os relativamente resistentes a uma próxima infecção; entretanto, nos casos da infecção em indivíduos imunocomprometidos (principalmente aqueles acometidos pelo HIV/aids), freqüentemente pode levar esses pacientes à morte.

Em indivíduos imunossuprimidos os estágios desenvolvimentais do parasita não estão confinados apenas ao trato gastrointestinal (FORGACS et al., 1983; MA et al., 1983; PITLIK et al., 1983 e TRAVIS et al., 1990). A diarreia, a perda de peso e as dores abdominais são os principais sinais clínicos da infecção e nos indivíduos imunossuprimidos é muito comum a ocorrência de um desequilíbrio eletrolítico grave.

As formas clínicas da criptosporidiose podem ser divididas em quatro categorias: assintomática, sintomática, crônica e fulminante. A forma assintomática, muito importante pelo seu potencial de transmissão endêmica, é transitória, com período de incubação de seis dias e uma duração de dois a 30 dias, presente apenas em indivíduos imunocompetentes. A sintomática caracteriza-se pelo aparecimento de diarreia aquosa, desconforto abdominal, anorexia e febre. As formas crônica e fulminante são características de indivíduos com o sistema imunológico comprometido, evidenciadas pela diarreia incontrolável, causando desidratação e desnutrição intensas, com conseqüente agravamento clínico; principalmente na fulminante, que acomete os portadores do HIV, ou imunossuprimidos pelo uso de drogas terapêuticas. Existem relatos de diarreia crônica, tipo colérica, em indivíduos subnutridos (GRIFFITHS, 1998).

Em estudo realizado por BLANSHARD et al. (1992) foi demonstrada uma prevalência de criptosporidiose de 5% em indivíduos portadores de HIV e de 21% nos pacientes com sintomas clínicos de aids; desse total, o curso fulminante ocorreu apenas naqueles cuja contagem de células CD4+ foi inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>.

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* parecem não despendem grandes esforços para evadirem-se do sistema imunológico dos hospedeiros, pois seus vários componentes de membrana, mais que os dos tradicionais coccídios entéricos conhecidos, como proteínas, glicoproteínas e fosfolípídeos, são fortemente imunogênicos e muitas dessas moléculas de superfície, tanto dos esporozoítos quanto dos merozoítos, reagem cruzadamente. Parece que o seu sucesso reside na habilidade de desenvolver-se rapidamente no interior dos organismos e sair para o meio ambiente em forma de resistência. De fato, se este parasito não fosse eficientemente eliminado do interior do hospedeiro causaria, em um curto espaço de tempo, uma grave desidratação, em função do desequilíbrio eletrolítico que levaria o hospedeiro à morte e conseqüentemente, à extinção dessa espécie. Portanto, parece plausível a afirmação de que o perfil imunológico desse parasita deva também representar uma estratégia para sua sobrevivência (HIJJAWI et al, 2001).

A infecção ocorre normalmente pela via fecal-oral e está universalmente distribuída no globo terrestre. Encontra-se documentada em 95 países e, dentre todos os continentes, só não é encontrada na Antártida, sendo considerada a zoonose emergente mais importante da atualidade (FAYER et al., 1997). CURRENT & GARCIA (1991) analisaram dados de prevalência mundial de criptosporidiose que indicaram que sua disseminação é maior em áreas mais pobres, carentes de infra-estrutura de distribuição de água e de coleta de esgoto, tendo sido considerada a mais significativa das patologias causadoras de diarreia.

Um microorganismo é considerado um patógeno emergente quando ocorrem mudanças em suas características individuais, ou nas suas vias de transmissão, ou ainda na suscetibilidade de seus hospedeiros, gerando como conseqüência disso um rápido aumento de sua incidência ou modificação de sua distribuição geográfica. As doenças infecciosas emergentes são aquelas que surgem numa população, ou que, embora já

existissem há algum tempo, apresentam repentinamente características de agravamento do seu quadro (MORSE, 1995).

WOLFSON et al. (1985) no Nordeste dos Estados Unidos, examinaram fezes de indivíduos imunocompetentes, de várias idades e referem que houve maior prevalência da criptosporidiose entre crianças de até quatro anos de idade e entre adultos de 30 a 39 anos. PEREZ - SCHAEEL et al., neste mesmo ano (1985), na Venezuela, examinaram fezes de crianças imunocompetentes, com diarreia aguda e verificaram a prevalência de 10% de positividade.

Numa faixa etária de 1 a 2 anos, LOUREIRO et al. (1989), no Norte do Brasil, detectaram uma positividade de 5,2% em amostras de fezes diarreicas. GUIZELINI & AMATO NETO (1992) realizaram um estudo no Estado de São Paulo, incluindo imunodeficientes portadores de HIV/aids, crianças e adultos imunocompetentes, quando encontraram um percentual total de 10,4%, tendo sido a maior prevalência nas crianças e nos pacientes de Aids. Na avaliação do impacto no estado nutricional e na doença diarreica causada pelo *Cryptosporidium*, AGNEW et al. (1998), determinam que a criptosporidiose é um importante marcador de morbidade em crianças com idade inferior ou igual a 1 ano. CIMMERMAN et al. (1999) determinaram uma prevalência de 7% de criptosporidiose em portadores de HIV/aids, também no Estado de São Paulo.

A transmissão dessa infecção pode ser direta, representada tanto pelo contato indivíduo – indivíduo, quanto pelo contato animal – indivíduo; ou indireta, quando a ingestão dos oocistos se dá através de alimentos ou água, contaminadas (WHO, 1985a, 1985b).

Em 1996, FRANCO & CORDEIRO, relataram a presença de “*C. parvum*” nas fezes de crianças com dois a 60 meses de idade, que freqüentavam creches, evidenciando a importância da transmissão interpessoal, pois 73,6% dos resultados positivos eram provenientes de famílias onde existia pelo menos um profissional da área da saúde. Neste mesmo período, num levantamento epidemiológico realizado em 17 países da Europa, foi constatado que a população mais exposta ao risco da criptosporidiose era a de homens que fizeram sexo com outros homens (PEDERSEN et al., 1996).

A transmissão de *Cryptosporidium sp* associada ao contato com animais está referida em STANTIC-PAVLINIC et al. (2003), quando das 338 amostras de fezes de indivíduos com enterite aguda, diagnosticadas positivas para o *C. parvum*, 49 eram provenientes de indivíduos que mantinham contato direto com animais.

A associação da criptosporidiose com a transmissão por veiculação hídrica encontra-se perfeitamente comprovada e vastamente registrada na literatura. O primeiro episódio de surto epidêmico, causado pelo *C. parvum* por veiculação hídrica está relatado por CURRENT et al (1983). A partir daí ocorreram muitos outros episódios que se encontram também documentados (LISLE & ROSE, 1995 e ROSE et al, 2002). O mais famoso surto de *C. parvum* por veiculação hídrica ocorreu na cidade de Milwaukee, Estados Unidos, em 1993 e afetou mais de 400.000 indivíduos (Mac KENZIE et al., 1994a, 1994 b). O CDC, no período de 1993 a 1994, relatou um índice de 71% de positividade para o *C. parvum* e *G. lamblia*, entre as doenças veiculadas pela água, conforme se refere GOSTIN et al., (2000).

Entre nós os dados de infecção por veiculação hídrica, estão referidos nos estudos de FRANCO et al. (2001) que detectaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium sp* nas águas do Rio Atibaia; FRANCO e CANTUSIO NETO (2002), que descreveram a presença de oocistos do protozoário do gênero *Cryptosporidium* em águas engarrafadas de fontes minerais não gasosas, comercialmente distribuídas nos supermercados de Campinas, SP e os mais recentes, descritos por BRANCO (2006), que detectou a presença de *Cryptosporidium spp.* em amostras de água de consumo, provenientes de fontes naturais, na cidade de Campos do Jordão, SP, detectando a presença do parasito em 25% delas e uma prevalência de 8,1% nas comunidades rurais.

No risco da transmissão do *Cryptosporidium* para os humanos por veiculação hídrica, estão envolvidos fatores biológicos, ambientais, comunitários e climáticos. Os fatores biológicos incluem: 1) Os níveis de oocistos eliminados nas fezes. Tem sido documentada na literatura uma produção elevada de oocistos por um tempo de eliminação que pode durar semanas (FAYER et al., 1997). 2) O potencial zoonótico do isolado, capaz de infectar aproximadamente 155 espécies de mamíferos, incluindo o homem (TZIPORI & GRIFFITHS, 1998; TZIPORI & WIDMER, 2000; ROSE et al., 2002, FAYER, 2005). GRAAF

et al (1999), descreveram a presença deste parasita em aves, ovinos, suínos e caprinos. 3) A estabilidade e infectividade dos oocistos, os quais, quando liberados no ambiente, já são capazes de provocar a infecção ao cair na água, podendo permanecer viáveis ainda por seis meses; a isso soma - se o fato de que, dependendo do isolado responsável, a infecção pode ocorrer com baixa dose (PENG et al., 1997; BAGLEY et al., 1998 e OKHUYSEN et al., 1999).

Os fatores ambientais incluem como componente principal a fonte de água. O *Cryptosporidium* é encontrado tanto em águas de superfície, quanto em águas profundas, embora no segundo caso, em menores concentrações (BAGLEY et al., 1998 e HANCOCK et al., 1998). Também estão relacionados ao tipo de atividade, que é desenvolvida próximo às coleções de água, as quais poderão vir facilitar a disseminação deste parasita. Por exemplo, águas próximas às áreas de pastagens de gado, ou plantio adubado com matéria orgânica oriunda de dejetos animais, ou ainda, áreas de esgoto, apresentam concentrações de oocistos de 10 a 100 vezes maiores (LERMAN DE ABRAMOVICH et al., 1999).

Os fatores comunitários, relacionados às atividades da população nas áreas próximas aos mananciais da água que lhes é servida, são os que incluem principalmente o manejo dos terrenos nas suas proximidades, que vão da utilização do solo para obtenção de alimentos e despejo de lixo ou dejetos e também para a realização de atividades de recreação (GIBSON et al., 1998). Por esta razão deve ser também considerada a existência ou não do tratamento da água e o tipo desse tratamento (ROSE, 1997).

Finalmente, os fatores relacionados ao clima, que incluem a temperatura e as chuvas. Correlação entre sazonalidade e aumento do número de casos de indivíduos infectados, está descrito por ATHERHOLT et al. (1998), que verificaram um aumento da concentração de oocistos em águas de rio, na época das chuvas, pelo acréscimo da quantidade de material particulado, por causa do revolvimento de sedimentos. Esses mesmos autores relatam que temperaturas mais baixas fornecem uma sobrevivência maior dos oocistos. KISTEMANN et al. (2002) encontraram uma relação direta entre índices pluviométricos elevados e concentrações crescentes de oocistos presentes na água. Esse aumento da concentração dos oocistos também é bastante comum desde o início do verão até o início do outono, sendo que durante o verão este aumento é de cinco a seis vezes

maior, sendo também nestas épocas do ano mais freqüentes as atividades recreativas na água (HLAVSA et al., 2002).

Considera-se disponível uma grande variedade de métodos para detecção de *Cryptosporidium*. Originalmente, as técnicas de diagnóstico rotineiras para o diagnóstico clínico-laboratorial, baseavam-se principalmente no reconhecimento de características específicas dos oocistos, após coloração e visualização em microscopia de luz, sendo a mais utilizada a técnica modificada de Ziehl-Neelsen, a qual está baseada na propriedade de resistência dos oocistos ao álcool acidificado (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981 e MARTINEZ & BELDA NETO, 2001), considerada atualmente como a metodologia padrão. Entretanto, nesse caso pode ocorrer a interferência de alguns microorganismos que são facilmente confundidos com o *Cryptosporidium*, incluindo certas leveduras e algas, além do que não é recomendada para a pesquisa de oocistos recuperados da água (TZIPORI, 1988, GONZALEZ – RUIZ et al., 1995).

Atualmente o diagnóstico clínico de criptosporidiose baseia-se em métodos imunológicos, buscando a identificação de antígenos de oocistos nos esfregaços fecais de indivíduos com diarreia, mediante a utilização de anticorpos monoclonais marcados com enzimas, os ensaios imunoenzimáticos, ou com fluorocromos, a imunofluorescência direta, os quais encontram-se disponíveis no mercado em vários “kits” comerciais (MEHTA, 2002 e MARQUES et al., 2005). Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp em amostras de água, previamente concentradas, estão aprovados apenas os testes de imunofluorescência direta (MARQUES et al., 2005). A positividade nos testes imunoenzimáticos será dada pela medida da densidade ótica aumentada em relação ao “cut off” e, em imunofluorescência direta, se forem encontradas estruturas ovóides ou esféricas, medindo 4 a 6µm, exibindo fluorescência verde brilhante, preferencialmente com destaque para a sutura do oocisto (ARROWOOD, 1997). A técnica de Ziehl – Neelsen, para identificação das formas infectantes de *Cryptosporidium*, baseada na resistência à descoloração dos oocistos pelo álcool ácido, continua sendo a melhor escolha (FRANCO & CORDEIRO, 1996).

KEHL et al. (1995) realizaram um estudo comparativo entre várias técnicas para detecção de oocistos em amostras fecais, incluindo tanto as de coloração e visualização em microscopia de luz, quanto as imunoenzimáticas, demonstrando que

nenhuma foi suficiente para detectar todos os positivos, embora todas tenham apresentado especificidade em torno de 98,6 até 100%, concluindo que os métodos imunoenzimáticos não foram mais sensíveis que a detecção visual do parasita.

Já foi demonstrado que a resposta imunológica ocorre na infecção pelo *C. parvum* com a participação das principais classes de imunoglobulinas séricas, a saber: IgM, na infecção recente, IgG na infecção posterior e IgA (CHAPPELL et al., 1999). Esses achados, entretanto, não têm utilidade para valor diagnóstico clínico, principalmente nos casos de indivíduos portadores de HIV, com episódios de diarreia para esclarecimento da etiologia, mas têm-se tornado úteis para o levantamento epidemiológico de criptosporidiose (RIEPIERANT et al., 1994).

Até o momento não existe qualquer terapia eficaz contra a criptosporidiose em humanos. A pouca viabilidade e reprodutibilidade dos métodos para testes de drogas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, não permitiram os avanços necessários para a identificação de fármacos (BLAGBURN & SOAVE, 1997). Disponíveis para o tratamento da criptosporidiose têm-se drogas cujos potenciais principais residem no fato de serem utilizadas no tratamento de parasitoses relacionadas. Em primeiro lugar, os Macrolídeos, utilizados no tratamento de infecções causadas pelo *Toxoplasma gondii*; do qual fazem parte a Spiramicina, a Azitromicina e a Claritromicina; os derivados da Benzenoacetoneitrila, o Diclazuril e o Letrazuril, que exercem atividade comprovada contra a *Eimeria*; a Paromomicina (ou Aminosidina), usada como amebicida; o Atovaquone, anti-malárico, também avaliado para o tratamento da infecção pelo *Pneumocystis carinii* e a Difluorometilornitina, a menos recomendada de todas as drogas anti-parasitárias, devido ao seu alto grau de toxicidade para os humanos. Algumas drogas com ação anti-diarreica também têm sido utilizadas, como é o caso do Kaolin-Pectina e do Subsalicilato de Bismuto (FAYER et al., 1997). Finalmente, o Nitazoxanide, cuja especialidade farmacêutica é o Anita, que possui amplo espectro de ação direcionado contra bactérias, helmintos e protozoários, incluindo flagelados e coccídios, o qual foi recentemente aprovado pelo serviço de fiscalização dos EUA (FDA) para o tratamento de crianças com diagnóstico de criptosporidiose (GILLES & HOFFMAN, 2002).

## 1.1 CRIPTOSPORIDIOSE EXPERIMENTAL

O *Cryptosporidium* é predominantemente um parasita de animais neonatos. Embora possam ocorrer algumas exceções, animais mais velhos geralmente desenvolvem infecções mais leves, mesmo quando expostos ao parasita pela primeira vez. Ensaios experimentais de laboratório, utilizando animais adultos imunossuprimidos, mostram que as infecções têm um curso lento e raramente evoluem para as formas mais graves encontradas nos neonatos. Nos humanos, entretanto, a infecção pelo *C. parvum* pode ocorrer em qualquer época de suas vidas e uma exposição prévia ao parasita geralmente resulta numa imunidade total ou parcial (CACCIÓ, 2005).

A capacidade do *C. parvum* infectar várias espécies de hospedeiros animais, preferencialmente durante as 3 primeiras semanas de vida, constitui um dos principais problemas para a criptosporidiose experimental em mamíferos (UNGAR et al., 1990).

Uma grande variedade de espécies animais têm sido usadas com a finalidade de definir modelos experimentais que reproduzam a infecção humana, para conhecimento de sua biologia, para testes de drogas, ou para manutenção e obtenção de formas do parasita, que incluem o gado: bovino, ovino, caprino; e roedores, principalmente ratos e camundongos (FAYER, 2005).

Os camundongos são os modelos experimentais mais usados para o estudo das infecções pelo *Cryptosporidium* e embora inicialmente tenham sido testadas várias linhagens, a resistência de animais adultos é uma característica predominante. SHERWOOD et al. (1982), testando oito linhagens de camundongos isogênicos e heterogênicos, neonatos e com 21 dias de idade, concluíram haver suscetibilidade entre todos os neonatos; entretanto, havia diferentes suscetibilidades entre os animais adultos, sendo alguns deles resistentes. ENRIQUEZ & STERLING (1991) avaliaram 19 linhagens de camundongos adultos e uma de gerbil, demonstrando que no 7º dia após a infecção, apenas os camundongos da linhagem C57BL/6J - *bg*, apresentavam número significativo de parasitas.

A dinâmica da suscetibilidade de camundongos neonatos da linhagem BALB/c, ao gênero *Cryptosporidium* (NOVAK & STERLING, 1991), revelou que esses animais são suscetíveis a partir do nascimento e até o 14º dia de idade.

ALVES (2004) avaliou a dinâmica de eliminação de oocistos e a histopatologia da infecção no jejuno, íleo e cólon, em seis linhagens de camundongos, incluindo imunodeficientes e seus controles, infectados com uma cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp (BRITTO et al., 2000). Embora todas as linhagens imunodeficientes tenham apresentado um quadro de infecção aguda, com liberação de quantidades significativas de oocistos, além de alta taxa de mortalidade, adultos da linhagem C57BL/6 KO (“knockout”) para Interferon-Gama, demonstrou ser o melhor modelo para o estudo dessa infecção.

A manutenção de isolados de *Cryptosporidium in vitro* surgiu inicialmente da necessidade da obtenção de grandes quantidades de oocistos para serem usados como matéria prima para realização de ensaios diagnósticos e, logo em seguida, para os numerosos ensaios de drogas com ação anti-parasitária (UPTON et al., 1994a; 1994b; 1994c e WOODS et al., 1996). LACHARME et al. (2004) sugere que o cultivo *in vitro* de *Cryptosporidium* poderá fornecer dados importantes para o conhecimento da interação entre o protozoário e a célula hospedeira, na ausência de bactérias intestinais.

WOODMANSEE & POLENZ (1983) detêm a primazia do primeiro cultivo *in vitro* de *Cryptosporidium* isolado de gado bovino em células de tumor retal humano, HRT, demonstrando, após três dias de cultivo por microscopia ótica e imunofluorescência direta, formas assexuadas do ciclo do parasita.

Merece destaque o cultivo de isolados do parasita de humanos e de bovinos em embriões de galinha, quando não foram notadas quaisquer diferenças nas formas obtidas; salientando que essas formas da cultura foram capazes de infectar camundongos neonatos (CURRENT & LONG, 1983), embora este resultado não tenha sido reproduzido por outros autores.

CURRENT & HAYNES (1984), utilizando três linhagens de células epiteliais, uma de origem humana, outra de origem suína e uma terceira, de cultura primária de embriões de galinha, que foram infectadas com um isolado procedente de paciente portador de HIV mantido em caprinos, obtiveram o desenvolvimento completo do ciclo até a formação dos oocistos, principalmente na linhagem humana. Após 96 horas de cultivo, merontes tipo I foram detectados e considerados como evidência de novos ciclos na cultura. Infelizmente estes dados também não foram mais repetidos.

NACIRI et al. (1986) também realizaram cultivo em embrião de galinha de um isolado humano de *Cryptosporidium*, mantido em caprinos. Relatam a transferência semanal do isolado, que a partir da 45ª passagem apresentava principalmente, esporozoítos e merozoítos livres no fluido corioalantóico. Entretanto, esses autores identificam o parasita como *C. muris*, embora a descrição morfológica seja mais consistente com a do *C. parvum*.

Outro dado de realização completa do ciclo biológico, foi obtido a partir da infecção de um isolado humano em duas linhagens celulares: a primeira, originada de adenocarcinoma humano, Caco-2, onde evidenciaram claramente a presença de oocistos; e a segunda, de cultura primária de hepatócitos de ratos, onde evidenciaram a presença de estágios sexuais, assexuais e oocistos (DATRY et al., 1989). Esta experiência relata a primeira realização completa do ciclo biológico do parasita *in vitro*.

No início da década de 90, a aplicação do cultivo celular *in vitro* objetivou principalmente os testes para avaliação das drogas de ação anti-parasitária, pois muitos ensaios biológicos, utilizando modelos animais, tornavam-se impraticáveis, principalmente em razão dos protocolos de ética em experimentação animal. Em 1990, Mc DONALD et al., BONNIN et al., bem como em 1991, FLANIGAN et al., testando isolados obtidos de bovinos e humanos portadores de HIV, em variadas células epiteliais, originadas de camundongos, ratos e humanos, respectivamente, evidenciaram a presença de estágios em desenvolvimento de *C. parvum*. Merecendo destaque os ensaios referidos em primeiro lugar, que relatam os achados de 90% de formas assexuais e 10% de formas sexuais, embora não tenham conseguido a reciclagem da cultura.

Também em 1991, GUT et al., testando o isolado bovino, denominado AUCP, em 15 linhagens, verificam nas células MDBK (Madin Darby bovine kidney cells) e MDCK (Madin Darby canine kidney cells), o ciclo completo do parasita, entretanto verificaram que as paredes celulares dos oocistos estariam apenas parcialmente formadas.

KUHLS et al. (1991), cultivando um isolado bovino, denominado IOWA, em células embriônicas de intestino humano, tratadas com carboidratos ou lectinas, para influenciar o curso da infecção, após 12 a 18 horas de cultivo, demonstraram o desenvolvimento de formas assexuadas.

É interessante referir sobre os ensaios de MARTINEZ et al. (1992), que utilizam macrófagos peritoniais no cultivo de *Cryptosporidium*, obtendo estágios diferenciados do ciclo biológico do parasita.

Em 1993, RAMUSSEN et al., com um isolado bovino, infectam células de carcinoma endometrial humano (RL95-2) e conseguem tanto os estágios sexuais como os estágios assexuados do parasita. Neste mesmo ano, ROSALES et al. (1993), também com um isolado bovino, faz um estudo comparativo entre a infecção em quatro linhagens celulares diferentes, estabelecendo que as células MDCK são as melhores para o cultivo de *C. parvum* e demonstrando também a reciclagem dos estágios assexuados.

UPTON et al. testando isolados bovinos, em células MDBK e mais 10 linhagens celulares diferentes (1994b), elegendo esta mesma célula como padrão, definiram a linhagem HCT-8 (célula tumoral humana) como a que melhor suporta a infecção pelo *C. parvum*, apresentando pelo menos duas vezes mais o número de formas de desenvolvimento do parasita, do que qualquer outra célula.

ADAMS et al. (1994) e YANG et al. (1996), cultivando células epiteliais, o primeiro a T.84 e o segundo da Trompa de Falópio, revelam achados de formas sexuais e assexuadas. O segundo também refere a infecção de camundongos com o sobrenadante da cultura.

VILLACORTA et al. (1996) evidenciam o completo desenvolvimento do *C. parvum* de origem bovina em células MDBK. MAILLOT et al. (1997) também evidenciam o ciclo completo do parasita de origem bovina, em cinco linhagens celulares de origem humana, quando testam o potencial de infecção do cultivo com oocistos e esporozoítos, concluindo que não há diferença nessas formas e ainda, que a exposição aos sais biliares não afeta a infectividade dos esporozoítos.

HIJJAWI et al. (2001) relatam o completo desenvolvimento dos genótipos humano (genótipo 1) e bovino (genótipo 2), em cultivo *in vitro* de longa duração, em células HCT-8, quando obtiveram a produção desde esporozoítos até oocistos esporulados. Esses mesmos autores observaram que o cultivo *in vitro* dos genótipos humano e bovino foi similar, embora tenham referido que o intervalo dos ciclos parasitários foi variável: 72 horas pós-infecção para o genótipo humano e 120 horas para o bovino, além de que o cultivo do genótipo humano foi mais agressivo. Outra observação importante foi que os oocistos do genótipo bovino foram capazes de causar infecção experimental em camundongos, enquanto que os derivados do genótipo humano falharam.

ARROWOOD (2002) em sua revisão sobre cultivo *in vitro* de *Cryptosporidium* mais uma vez recomenda a linhagem celular HCT – 8 num protocolo para infecção com *Cryptosporidium*.

Encontra-se descrito mais recentemente na literatura, por HIJJAWI et al. (2004), o cultivo de *C. parvum*, genótipo bovino, sem a presença de células hospedeiras, suplementado com soro de bovinos recém-natos, quando foi verificada a multiplicação, o desenvolvimento e o ciclo biológico completo do parasita (formas assexuadas, detectadas no 3º dia e formas sexuadas, entre o 6º e o 7º dias da cultura). Esses mesmos autores também referem a infectividade dos oocistos retirados dessa cultura para camundongos ARC/Swiss, com 7 a 8 dias de idade.

A comparação entre ensaios de cultivo de *Cryptosporidium in vitro* e de sua infectividade em camundongos neonatos *in vivo* foi realizada por ROCHELE et al. (2002) com cinco isolados do genótipo 2 do parasita, quando demonstraram claramente a equivalência dos dois métodos, caracterizando os ensaios *in vitro* como uma excelente

alternativa para os estudos da inativação e infectividade dos oocistos. As linhagens celulares utilizadas foram a Caco - 2, a HCT – 8 (humanas) e a MDCK (canina) e os camundongos foram da linhagem CD –1.

Embora continue existindo a necessidade da caracterização de um modelo experimental, para mimetização da infecção humana pelo *Cryptosporidium*, o modelo animal tem seu uso limitado por várias desvantagens, como as questões éticas da experimentação animal, o alto custo para sua manutenção, o tempo que leva para a obtenção dos resultados (em média 7 a 10 dias), as diferentes suscetibilidades das várias linhagens de camundongos, o padrão genético de alguns animais, que por não serem de linhagens “inbred”, podem apresentar resultados que necessitem de análise individual e finalmente, a necessidade de vários outros protocolos laboratoriais para a finalização destes experimentos (ROCHELLE et al. 2002, apud FRANCO et al., dados não publicados).

Embora o cultivo *in vitro* possa servir a uma grande variedade de campos de pesquisa, ainda se faz necessária a elaboração de novos protocolos padronizados e facilmente reproduzidos, que permitam a caracterização e diferenciação dos inúmeros isolados e das várias formas durante a realização do ciclo biológico, também para a realização de testes terapêuticos anti - *Cryptosporidium*, tanto com drogas recém-descobertas, como com as que já se encontram em uso, visando melhor adequar suas formas de apresentação, ou doses e finalmente, para a avaliação de métodos de desinfecção ambiental, que permitam o desejado controle dessa infecção, pois a transmissão do *C. parvum*, principalmente por veiculação hídrica, permanece como um grave problema de saúde pública em todo o mundo (MARSHALL et al., 2002).

Cerca de 100 anos depois de ter sido descoberto e de mais de duas décadas de intensas investigações, *Cryptosporidium* sp continua sendo um enigma. Este parasito infecta as quatro classes de vertebrados e quase todos os mamíferos (TZIPORI & WARD, 2002), entretanto, a definição de suas espécies continua sendo um grande desafio para os taxonomistas e dentre as causas desse insucesso, destacam-se principalmente, a falta de espécies hospedeiras específicas, de modelos experimentais e a dificuldade do isolamento e da propagação de cepas.

Assim, propõe-se no presente trabalho a realização de protocolos de infecção *in vivo*, utilizando-se camundongos neonatos de várias linhagens, tanto isogenéticas, quanto heterogenéticas, mantidos em unidades isoladoras e livres de patógenos específicos e *in vitro*, num cultivo em monocamadas celulares, com uma nova cepa de *Cryptosporidium* spp de origem humana: MMC/Uni, obtida de um único paciente portador de HIV/aids.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores,  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons,  
Mas há os que lutam toda a vida e são imprescindíveis.”*

**Berthold Brecht**

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL:**

Manutenção experimental *in vivo* e *in vitro* de uma cepa de *Cryptosporidium* sp de origem humana, isolada de um paciente portador de HIV/aids.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Purificação de uma cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp, a partir de fezes de paciente portador de HIV/aids.
2. Infecção de camundongos neonatos com a cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp, após purificação.
3. Manutenção da cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp em camundongos neonatos de várias linhagens tanto imunocompetentes como imunodeficientes.
4. Infecção da linhagem celular MDBK com a cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp.
5. Determinação do tempo de conservação da cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp.

*“Navegar é preciso,  
Viver não é preciso...  
...Viver não é necessário,  
O que é necessário é criar.”*

**Fernando Pessoa**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1 OBTENÇÃO DO *Cryptosporidium sp*:**

A cepa do *Cryptosporidium sp* foi isolada a partir do material fecal diarréico de um único paciente, do sexo masculino, portador de HIV/aids, com diagnóstico de criptosporidiose, procedente do Hospital das Clínicas da Unicamp e identificado como MMC/Uni.

As fezes aquosas e recentes desse paciente foram recolhidas dos recipientes destinados para esse fim e imediatamente colocadas em igual volume de uma Solução de Dicromato de Potássio a 5% e em seguida conservadas à 4°C, por 48 horas, conforme referido por CURRENT & GARCIA (1991).

#### **3.2 PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium sp*:**

O protocolo para a purificação dos oocistos consistiu da combinação de vários métodos descritos na literatura (CURRENT & GARCIA, 1991 e TZIPORI, 1998), com destaque especial para aquele descrito por CURRENT (1990).

Inicialmente, todo o material fecal foi passado em gaze, apenas 1 vez, pois se tratava de material bastante aquoso, sem necessidade de debridação. Em seguida, o filtrado foi deixado em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente, para sedimentação do material floculento. Depois, a parte do sobrenadante, imediatamente superior ao precipitado, correspondendo aproximadamente a 1/3 do volume total de cada frasco, foi retirado e tratada com Éter Etílico refrigerado, para a eliminação de material gorduroso. Não realizamos a centrifugação inicial recomendada, pois conforme já nos referimos o material fecal estava bastante diluído e o processo de centrifugação só serviria para carregar as sujidades do material para a camada posteriormente retirada, onde haveria a maior concentração dos oocistos. A solução de Éter Etílico foi misturada em volumes iguais aos filtrados fecais que em seguida foram vigorosamente agitados, durante aproximadamente

30 segundos, tendo-se aguardado um breve período para a formação das distintas camadas e posterior retirada das fases aquosas, ricas em oocistos, que foram lavadas exaustivamente em PBS 0,01M, pH 7,2-7,4, acrescido de 0,2% de Tween 20, por centrifugação a 1500 x g, durante 10 minutos, a 4°C, até que não fosse mais verificado qualquer vestígio do dicromato. Os precipitados foram então ajuntados a 2,5mL dessa mesma solução-tampão.

A esses precipitados, coletados em tubos cônicos, foram adicionados 15mL de Solução saturada de Sacarose ( $d = 1,2 \text{ g/cm}^3$ ), após o que foram mais uma vez vigorosamente agitados e centrifugados a 1000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. Logo após foram gentilmente colocados, pelas paredes dos tubos, 2,5 mL de uma solução aquosa de Tween 20 a 0,2%. Em seguida, juntamente com as camadas aquosas, foram retiradas as camadas mais superiores. Finalmente foram lavadas 4-6 vezes, por centrifugação a 1500 x g, durante 10 minutos a 4°C, em PBS 0,01M pH 7,2 e os precipitados finais foram resuspenso em 1mL da mesma solução de PBS, ajuntados e submetidos à pesquisa e determinação do número de oocistos presentes na amostra.

A presença de oocistos foi verificada pela observação dos esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (FRANCO & CORDEIRO, 1996).

Essa suspensão de oocistos purificados foi armazenada em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, a 4°C, tendo sido denominada MMC/Uni.

### **3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium sp*:**

De acordo com o protocolo descrito por PEETERS & VILLACORTA (1995), alíquotas de 20µL da suspensão de oocistos purificados em PBS 0,01M, pH 7,2, foram adicionadas a 80µL de uma solução aquosa de Verde Malaquita a 0,16% mais 0,1% de SDS. A seguir, 10 µl dessa mistura foi colocada em Câmara de Neubauer. Cerca de 2 a 4 minutos depois, os oocistos foram contados, utilizando-se objetiva de 40x em Microscopia de Fase.

Para os experimentos de infecção de camundongos, o número total de oocistos foi ajustado para  $10^6$  oocistos/mL, em PBS estéril 0,01M, pH 7,2. Nos experimentos para determinação de viabilidade dos oocistos conservados a  $-90^{\circ}\text{C}$ , esse foi também o número de oocistos. Para os experimentos de infecção de linhagem celular, o número total de oocistos foi ajustado para  $10^7$  oocistos/mL, no meio de cultivo apropriado.

### **3.4 INFECÇÃO *in vivo*:**

O protocolo experimental nº 1304-1, inerente à este trabalho foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

#### **3.4.1 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS NEONATOS SPF COM A CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium sp*:**

Camundongos procedentes do CEMIB (UNICAMP), livres de patógenos específicos (SPF), neonatos com 1 a 4 dias de idade, de linhagens imunocompetentes heterogênicas como o Swiss/Uni, ou isogênicas tais como, A/Uni, BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, DBA/2, SJL; e imunodeficientes isogênicos, como CBA/Uni/*xid*, C.B-17/Uni/*scid* e C57BL/6/Uni/*bg* (SHERWOOD et al., 1982 e ENRIQUEZ & STERLING, 1991), foram juntamente com suas mães, introduzidos em unidades isoladoras, conforme descrito por PASSOS & ALVES (1996), no Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia da UNICAMP e lá foram mantidos durante o tempo necessário para a continuidade do experimento, o qual variou de 4 a 9 dias, sendo a maioria deles realizado durante 7 dias.

As unidades isoladoras foram previamente esterilizadas pelo vapor de Amônio durante 48 horas pelo menos e, após esse tempo, eram introduzidos nos isoladores todos os materiais e insumos necessários para a realização do experimento e para a manutenção dos animais. Todo e qualquer material antes de ser introduzido também foi esterilizado, mediante processos físicos ou químicos, conforme o caso. O processo físico adotado foi o calor úmido, em autoclave, por 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . O processo químico consistiu de desinfecção por nebulização pelo Ácido Peracético. Ao término dos experimentos todos os

materiais retirados das unidades isoladoras foram submetidos à autoclavagem, segundo suas características próprias, antes do descarte, como norma padrão de biossegurança adotada pelo laboratório.

As matrizes da colônia de camundongos SPF adotadas nos experimentos foram avaliadas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP (GILIOLI et al., 1996; 2000).

Após 12 a 24 horas da sua introdução nas unidades isoladoras, os neonatos foram infectados por tubagem intragástrica com 100µL da suspensão contendo  $10^6$  oocistos/mL, em PBS estéril 0,01M, pH 7,2. Cerca de duas horas antes da infecção, os camundongos neonatos foram separados de suas mães, com a intenção de evitar que fossem amamentados, prevenindo a regurgitação.

No 7º dia depois da infecção, os neonatos e suas mães foram removidos das unidades isoladoras. As mães e neonatos foram sacrificadas por deslocamento cervical.

O intestino de cada neonato foi removido e mantido em solução de PBS 0,01M, pH 7,2-7,4 com 0,2% de Tween 20 gelado, até serem individualmente processados por trituração no Homogeneizador de Biozzi, com o mesmo PBS, adicionado de KOH a 10% (5 a 10 gotas por mL da solução), para retirada do excesso de muco.

Em seguida, todos os homogenados foram filtrados em malhas de nylon e lavados em PBS 0,01M, pH 7,2-7,4 a 1.500 x g, por 10 minutos a 4°C. Os centrifugados foram então deixados em repouso por 1 - 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, a camada imediatamente superior ao precipitado (buffy coat) foi retirada e lavada por 3 vezes em PBS 0,01M, pH 7,2-7,4, contendo 0,2% de Tween 20, a 1.500 x g, por 10 minutos, a 4°C. Após a última centrifugação, os precipitados foram resuspensores em 2,5mL da mesma solução de PBS – Tween, em tubos cônicos.

A essas suspensões de 2,5mL foram adicionados 15 mL de solução saturada de Sacarose ( $d = 1,2 \text{ g/cm}^3$ ). Imediatamente após a adição de sacarose foram agitados vigorosamente e submetidos à centrifugação a 1000 x g, durante 10 minutos, à 4°C. Quando

a flutuação apresentava distintamente a fase superior aquosa, procedia-se à dispensação lenta e cuidadosa pelas paredes dos tubos, de 2,5 mL de uma solução aquosa a 0,2% de Tween 20. Quando acontecia o contrário, isto é, quando não havia nitidez, principalmente em consequência do excesso de muco do lavado intestinal, tomava-se o líquido correspondente à metade do tubo (da camada superior para a inferior), cujo volume correspondia aproximadamente a 7,5mL e procedia-se à nova separação por Sacarose, nas mesmas condições acima descritas. Esse procedimento foi repetido no máximo 3 vezes, em cada experimento.

Posteriormente, os oocistos foram retirados das camadas superiores aquosas e lavados 3 vezes por centrifugação a 1.500 x g, durante 10 minutos a 4°C. Finalmente os precipitados foram resuspenso em 1 mL de PBS estéril 0,01M pH 7,2 e contados em Câmara de Neubauer, conforme acima descrito, sendo o número de oocistos ajustados na solução para  $10^6$  ou  $10^7$  oocistos/mL, de acordo com a finalidade.

Não houve a enumeração individual da carga parasitária dos camundongos face à presença excessiva de muco, tendo sido considerado sempre o “pool” de amostras para a quantificação.

### **3.4.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp:**

Para a manutenção da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, os camundongos imunocompetentes e imunodeficientes, recém-nascidos e suas respectivas mães, de qualquer uma das linhagens acima descritas, foram semanalmente introduzidos nas unidades isoladoras e, em seguida, foram infectados, conforme anteriormente descrito. Os parasitas utilizados para cada infecção foram obtidos de neonatos infectados uma semana antes, de acordo com o protocolo também já referido.

Nos períodos em que houve necessidade da interrupção das passagens do isolado humano MMC/Uni em neonatos, seus lavados intestinais, após os procedimentos iniciais de maceração e de filtração em nylon, eram misturados a volumes iguais de solução de Dicromato de Potássio a 5% e mantidos a 4°C até o próximo repique, quando eram então

realizados os procedimentos inicialmente descritos para os protocolos de purificação e quantificação de oocistos.

As amostras dos lavados intestinais acima referidas, que foram submetidas apenas aos processos iniciais de tratamento para a purificação, como maceração e filtração receberam a denominação de “amostras brutas”.

Em uma única ocasião, os parasitas utilizados para a infecção dos neonatos foram obtidos da suspensão fecal de camundongos adultos imunodeficientes na produção de Interferon Gama e foi processada da mesma maneira, daquela anteriormente descrita para os lavados intestinais dos neonatos. Nessa época a manutenção da cepa em neonatos já havia sido estabelecida.

### **3.5 INFECÇÃO *in vitro*:**

#### **3.5.1 EXCISTAÇÃO DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp:**

Oocistos de *Cryptosporidium* da cepa MMC/Uni, obtidos de acordo com o protocolo anteriormente referido, ajustados para uma concentração de  $10^7$  parasitas/mL em PBS estéril 0,01M pH 7.2, foram tratados com uma solução antibiótica-antimicótica, para eliminar a contaminação por microorganismos, como bactérias e fungos, segundo protocolo descrito por VILLACORTA et al. (1996): 200U de Penicilina mais 200U de Gentamicina e mais 3,12ug de Anfotericina B em cada 1 mL da suspensão de oocistos.

Em seguida foram deixados sob refrigeração a 4°C, por 16 horas e tratados com uma solução de Hipoclorito de Sódio a 5,25%, num banho de gelo, durante 8 minutos. Depois desse período, a suspensão de oocistos foi imediatamente lavada uma única vez no mesmo PBS gelado, por centrifugação a 1500 x g, durante 10 minutos, a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e juntando-se ao precipitado 6mL de uma solução de Tiosulfato de Sódio a 1,05% e novamente centrifugado a 1500 x g, durante 10 minutos, a 4°C. Em seguida foi lavado em PBS por centrifugação a 1500 x g, durante 10 minutos, a 4°C.

Esse procedimento foi repetido três vezes, para a retirada total do Hipoclorito, seguido da última lavagem, nas mesmas condições, com o meio de EAGLE-MEM e reconstituição do volume inicial com o mesmo meio. Os esporozoítos foram liberados pela incubação da suspensão dos oocistos a 37°C com 0,22% de Desoxicolato de Sódio (Sigma) e 0,04% de Tripsina Bovina em PBS, durante 45 minutos. Finalmente o isolado foi lavado 3 vezes no mesmo meio de cultivo a 1500 x g, durante 20 minutos, a 4°C e o precipitado resuspenso para o volume inicial no mesmo meio.

A suspensão de esporozoítos obtida foi imediatamente empregada para a infecção das células hospedeiras.

### **3.5.2 CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM MDBK:**

A linhagem celular MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), foi gentilmente cedida pela Profª Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP e está reconhecidamente descrita na literatura como modelo para a propagação do *Cryptosporidium in vitro* (UPTON et al., 1994a e 1994b; VILLACORTA et al., 1996). A linhagem celular foi mantida em meio EAGLE-MEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubado a 37°C, sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub> e 85% de umidade relativa.

### **3.5.3 CULTIVO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp EM CÉLULAS MDBK:**

Nos experimentos de infecção das células, foram adotados os protocolos descritos na literatura (UPTON et al., 1994a e 1994b; VILLACORTA et al. 1996), adaptados às condições disponíveis no laboratório. As células MDBK foram cultivadas em placas de 24 concavidades, contendo lamínulas de vidro, em Meio EAGLE-MEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), adicionado ainda de solução de Penicilina (200UI/mL), solução de Estreptomicina (200µg/mL) e solução de Fungizona (2µg/mL). Em cada

concauidade das microplacas foram colocadas  $2 \times 10^5$  células/mL e o cultivo foi mantido em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , num ambiente com 85% de umidade relativa e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 12 - 24 horas, as monocamadas com confluência de 75% foram infectadas com a cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp.

Na etapa da infecção propriamente dita, as monocamadas foram lavadas por 3 vezes com  $200\mu\text{L}$  de EAGLE – MEM. Em seguida, esse mesmo volume de meio contendo  $10^6$  oocistos, excistados ou não, foram acrescentados nas concauidades em teste. Algumas concauidades não foram infectadas e serviram como controles. Aproximadamente duas horas depois da infecção, as monocamadas foram novamente lavadas por 3 vezes com EAGLE – MEM e, logo em seguida,  $1\text{mL}$  de EAGLE – MEM, suplementado com 4% de soro fetal bovino, foi acrescentado em cada concauidade. A placa foi mantida por 90 horas, em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , num ambiente com 85% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ . As placas foram observadas diariamente, para verificação das condições de aderência do tapete e de contaminação por microscopia ótica com objetiva de 40 X.

Ao final do tempo de cultivo, as lamínulas infectadas e as lamínulas controles foram lavadas por 3 a 6 vezes com Solução de PBS 0,01M, pH 7,2 - 7,4, deixadas para secar à temperatura ambiente, fixadas com Acetona a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos e posteriormente coradas pelo Giemsa. Finalmente, as lamínulas foram montadas em Entelan e observadas por microscopia ótica em óleo de imersão, com objetiva de 100 X, para detecção da presença de estágios de desenvolvimento do ciclo do *Cryptosporidium* sp.

### **3.6 CRIOPRESERVAÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp:**

Oocistos purificados da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foram separados em cinco amostras de  $300\mu\text{l}$ , contendo  $3 \times 10^5$  formas do parasita cada uma e congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  em bio-congelador, durante 10 meses, conforme o seguinte protocolo:

Amostra 1: Acondicionada em solução de PBS 0,01M, pH 7,2

Amostra 2: Acondicionada em meio MEM-EAGLE.

Amostra 3: Acondicionada em 9 partes de meio MEM-EAGLE e 1 parte de DMSO p.a. (Sigma)

Amostra 4: Acondicionada em 9 partes de meio MEM-EAGLE e 1 parte de Glicerina Bidestilada p.a. (MERCK).

Amostra 5: Acondicionada em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%.

### **3.7 TESTES DE INFECTIVIDADE DOS OOCISTOS DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp:**

Os testes de infectividade dos oocistos da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, tanto das amostras brutas, conservadas a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, por períodos que variaram de 4 até 16 meses, quanto dos oocistos purificados e mantidos congelados durante 10 meses a -90°C, foram realizados *in vivo*, por infecções em camundongos procedentes do CEMIB/UNICAMP.

Nos testes de infectividade das amostras brutas, foram utilizados camundongos neonatos, com 2 a 4 dias de vida, de quaisquer uma das linhagens anteriormente referidas.

No teste de infectividade dos oocistos purificados criopreservados, foram utilizados camundongos neonatos, com 4 dias de vida, da linhagem BALB/c/Uni. Para o teste propriamente dito, as amostras foram retiradas do congelador e imediatamente descongeladas a 37°C, em banho-maria. Em seguida foram lavadas por 2 vezes (amostras 1 e 2), 4 vezes (amostras 3 e 4) e 6 vezes (amostra 5), por centrifugação a 1500 x g, durante 10 minutos a 4°C, em PBS 0,01M pH 7,2. Os precipitados finais foram individualmente resuspensores na mesma solução de PBS. As alíquotas dos oocistos que receberam os diferentes tratamentos para o congelamento, acima discriminadas, serviram para a infecção de dois neonatos cada uma, os quais foram devidamente identificados.

Os protocolos das infecções foram os mesmos utilizados para a manutenção *in vivo* da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp e já está anteriormente referido.

No 7º dia depois da infecção, os camundongos foram sacrificados e seus lavados intestinais identificados conforme o inóculo utilizado. Esta tornou-se novamente a fonte de oocistos, que recebeu o tratamento convencional , cuja presença foi evidenciada pela observação em microscopia de fase, com objetiva 40 X (PEETERS & VILLACORTA, 1995).

*“A vida se torna uma festa quando sabemos desfrutar  
das coisas normais do dia-a-dia”*

**Phill Bosman**

#### **4. RESULTADOS:**

##### **4.1 OBTENÇÃO DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium sp*:**

Na Figura 1 estão evidenciados os oocistos de *Cryptosporidium sp* da cepa de origem humana MMC/Uni, nos esfregaços do material fecal obtido do portador de HIV/aids, com diagnóstico de criptosporidiose, corados pela técnica modificada de Ziehl - Neelsen, sob imersão, em microscopia ótica com objetiva 100 x (Slides A, B e C)

A cepa de origem humana de *Cryptosporidium sp* MMC/Uni foi obtida das fezes de um paciente portador de HIV/aids, com diagnóstico de criptosporidiose, proveniente do Hospital das Clínicas da Unicamp. O material fecal foi coletado num único momento. Inicialmente este material foi conservado em 2,5% de solução de Dicromato de Potássio, a 4°C e, posteriormente, submetido a tratamento para concentração e purificação dos oocistos.

Nenhum outro dado complementar da história clínica deste paciente foi resgatado, visto que no momento da coleta de seu material fecal, já havia ocorrido o seu óbito.

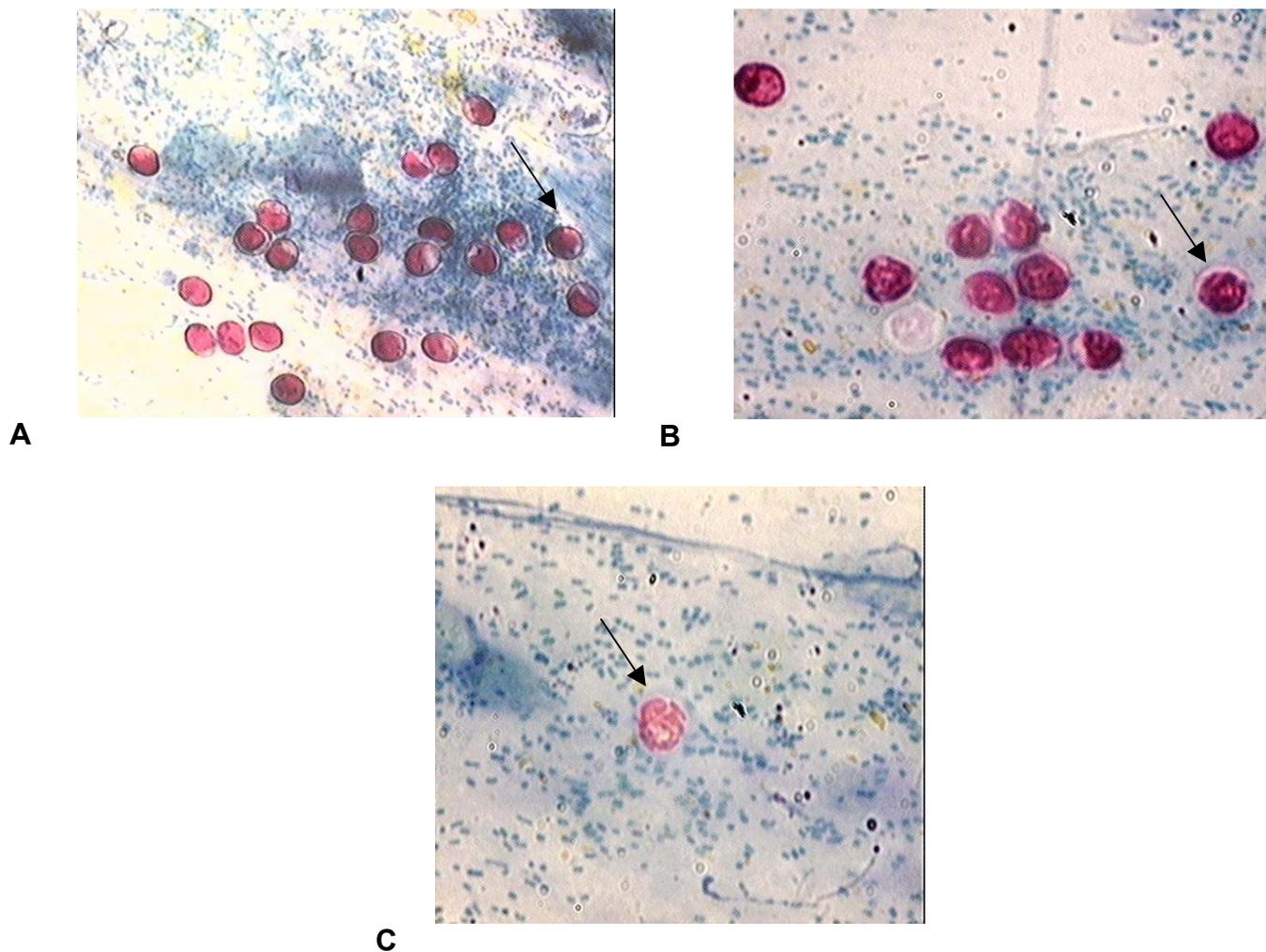


Figura 1 – Slides A, B e C:- Oocistos da linhagem de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp em esfregaços da suspensão fecal de paciente portador de HIV/aids, em microscopia ótica sob imersão (1.000 X). Coloração Ziehl-Neelsen modificada (FRANCO & CORDEIRO, 1996).

#### **4.2 MANUTENÇÃO *in vivo* DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp, EM CAMUNDONGOS:**

O cultivo *in vivo* da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp de origem humana foi realizado em camundongos, procedentes do CEMIB (UNICAMP), livres de patógenos específicos (SPF), mantidos em unidades isoladoras. Foram infectados neonatos com 1 a 4 dias de idade, de 7 linhagens imunocompetentes, incluindo 1 heterogênica, o Swiss/Uni; 6 isogênicas: A/Uni, BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, DBA/2, SJL; e de 3 linhagens imunodeficientes isogênicas: CBA/Uni/*xid* , C.B-17/Uni/*scid* e C57BL/6/Uni/*bg*.

O primeiro teste de infecção em camundongos com a cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, diretamente obtida de material fecal humano, foi realizado em 7 de dezembro de 1999 e foram utilizados 20 animais neonatos, com 2 a 4 dias de idade, imunodeficientes, da linhagem C57BL/6/Uni/*bg* e resultou no 4º dia após infecção, na sobrevivência de dois animais, os quais foram sacrificados neste mesmo dia, pois em várias tentativas anteriores todos os animais iam a óbito entre 24 e 72 horas pós-infecção (p.i). A presença de oocistos do pool dos lavados intestinais obtidos em camundongos foi evidenciada em esfregaços corados pela técnica do Ziehl – Neelsen modificada, sob microscopia ótica, com objetiva de imersão 100 x. Os lavados intestinais destes dois animais foram conservados em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, a 4°C. ALVES (2004), quando descreve a evolução da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp (Anexo I), não se refere a este primeiro experimento de infecção em animais.

Neste primeiro teste de infecção não foi determinada a concentração dos oocistos, porque o volume dos lavados intestinais dos animais foi muito reduzido, a opção foi, portanto, realizar a segunda infecção “cega”, em 14 de dezembro de 1999, em apenas 4 neonatos, num volume aproximado de 100µL para cada um. Aqui também os esfregaços realizados com os lavados intestinais corados pela técnica de Ziehl – Neelsen modificada, sob microscopia ótica com objetiva 100x, por imersão, evidenciaram a presença de oocistos. Mais uma vez, no quarto dia p.i. os quatro animais foram sacrificados. Nos protocolos descritos por ALVES (2004), no Anexo I, estes são os dados referidos como primeira infecção.

Dos lavados intestinais dos quatro neonatos sacrificados da segunda infecção, conservados durante 21 dias em partes iguais de solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, a 4°C, face aos feriados da época, foram obtidos 6mL de uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  oocistos/mL, previamente purificados e quantificados segundo protocolos descritos anteriormente em Material e Métodos. Nesta terceira infecção, que foi realizada em 10 de janeiro de 2000, 40 neonatos receberam uma dose equivalente a  $10^5$  oocistos cada um. Também nesta etapa os animais foram sacrificados antes do previsto, no 4º dia pós-infecção, pois já nesta ocasião o índice de mortalidade estava maior que 50%.

A partir dessa data foram realizadas infecções semanais consecutivas, com 5 a 9 dias de intervalo entre elas, até o dia 3 de julho de 2000. A presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp, da cepa de origem humana MMC/Uni, nos lavados intestinais dos neonatos obtidos semanalmente, após a purificação, foi sempre verificada em esfregaços corados pela técnica de Ziehl – Neelsen modificada, em microscopia ótica com objetiva 100x, por imersão, assim como pela evidênciação / quantificação, em microscopia de fase 40 X, por coloração em solução Verde Malaquita e SDS.

Na Figura 2 (Slides A e B) estão evidenciados os oocistos de *Cryptosporidium* sp da cepa de origem humana MMC/Uni, em microscopia de contraste de fase com objetiva 40 X, corados pela solução de Verde Malaquita 0,16% e SDS 0,1% (PEETERS & VILLACORTA, 1995), obtidos dos lavados intestinais de camundongos neonatos, SPF, de diferentes linhagens, após os procedimentos de concentração e purificação.

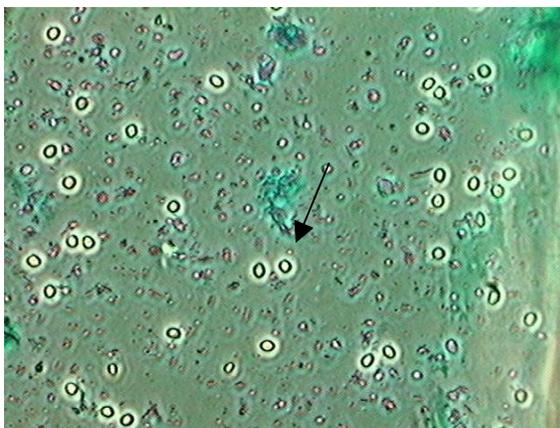
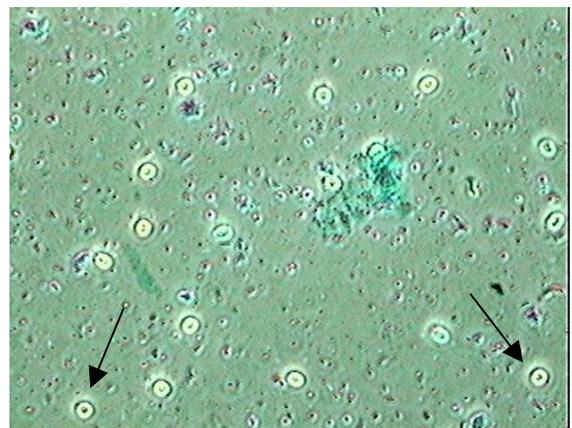
**A****B**

Figura 2 – Slides A e B: Oocistos da linhagem de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, obtidos dos lavados intestinais de neonatos de camundongos BALB/c/Uni, em microscopia de contraste de fase ( 40 x ). Coloração de Verde Malaquita (PEETERS & VILLACORTA, 1995).

Até este momento foram utilizados 637 animais e a cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foi passada pela 29ª vez em camundongos.

Os lavados intestinais dos camundongos, procedentes da 29ª infecção, obtidos 7 dias depois, em 10 de julho de 2000, foram conservados como amostra bruta, sob refrigeração a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio 2,5% para realização da 30ª infecção, que ocorreu em maio de 2001.

De maio a outubro de 2001, foram realizados repiques semanais, correspondendo a 20 passagens consecutivas da infecção. Nesse período foram utilizados 465 camundongos neonatos.

Em outubro de 2001, mais uma vez, os lavados intestinais dos neonatos, correspondentes à 49ª passagem da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foram conservados sob refrigeração a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, até a realização da 50ª infecção, que ocorreu em maio de 2002.

No período de maio a julho de 2002, foram realizadas 8 passagens semanais sucessivas da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, em 130 neonatos.

Em um total de 1232 camundongos neonatos SPF, de qualquer uma das linhagens acima referidas e totalizando 57 passagens, foi estabelecido o cultivo *in vivo* desta cepa de origem humana, MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, obtida de paciente portador de HIV/aids

Em novembro de 2002, a partir da 58ª passagem, MMC/Uni, começou a ser cultivada *in vivo* em camundongos adultos imunodeficientes, da linhagem C57BL/6 KO para Interferon Gama (ALVES, 2004).

Convém ressaltar que durante os experimentos nosso principal objetivo era a obtenção do maior número de formas do parasita, para garantirmos a manutenção da cepa. Por essa razão, aproveitávamos a disponibilidade de neonatos, independente das linhagens, para obtenção de grande quantidade de oocistos. Também por esta razão, não havia a necessidade da quantificação de oocistos individualmente nos animais.

Entretanto, no desenvolvimento de nosso trabalho, observamos que os lavados intestinais dos neonatos, os quais apresentavam menor quantidade de muco, facilitando as técnicas de concentração e resultando na obtenção de maior número de formas do parasito, eram aqueles obtidos nos experimentos de animais com idades de até no máximo 1 dia no momento da infecção, os quais eram sacrificados antes do 8º dia de vida.

Os experimentos de quantificação de oocistos incluíram sempre a observação de parâmetros definidos para validação da sua integridade, que compreendiam a presença do corpo residual e sua refringência, quando observados corados com solução de Verde Malaquita, em microscopia de fase em 40 x.

Quando por alguma razão os repiques semanais foram interrompidos, a cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp, MMC/Uni, foi conservada a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, a partir dos lavados intestinais dos camundongos neonatos “*in natura*”, isto é, sem sofrer qualquer processo de purificação. Nessas ocasiões a cepa MMC/Uni recebeu a denominação de “amostra bruta”.

O prazo máximo de conservação de MMC/Uni, a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio foi de 16 meses e constituiu-se da amostra proveniente da 61ª passagem, realizada em dezembro de 2002, a qual permaneceu infectante até março de 2004. É importante ressaltar que a alíquota, acima referida, proveniente da suspensão fecal dos camundongos adultos imunodeficientes, processada segundo o mesmo protocolo

referido para os lavados intestinais dos neonatos, serviu apenas para os testes de infectividade após conservação como “amostra bruta”.

Também não foram observadas diferenças na infectividade das amostras brutas da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, isolada de humanos, mantidas em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, a 4°C, por períodos de tempo que variaram de 4 até 16 meses.

Na Figura 3, está demonstrada a manutenção da cepa de origem humana MMC/Uni, de *Cryptosporidium* sp, em camundongos procedentes do CEMIB (UNICAMP), livres de patógenos específicos (SPF), neonatos com 1 a 4 dias de idade, de linhagens imunocompetentes heterogênicas como o Swiss/Uni, ou isogênicas tais como, A/Uni, BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, DBA/2, SJL; e imunodeficientes isogênicos, como CBA/Uni/*xid*, C.B-17/Uni/*scid* e C57BL/6/Uni/*bg*.

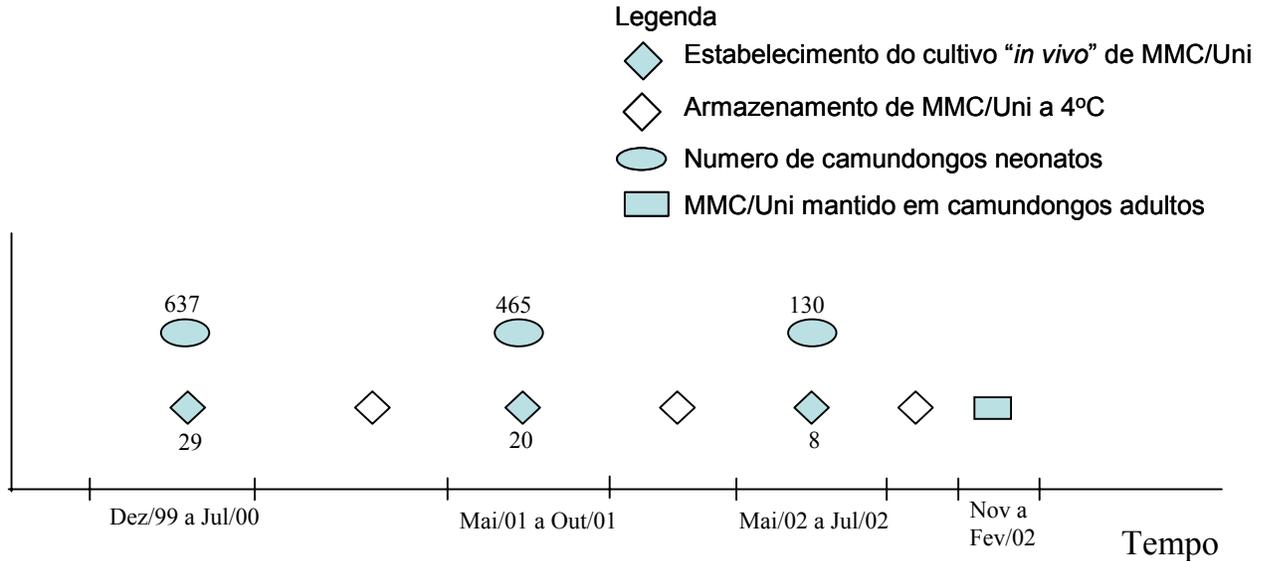


Figura 3 – Manutenção da cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp, MMC/Uni, em camundongos neonatos SPF, de diferentes linhagens mantidos em unidades isoladoras.

#### 4.3 MANUTENÇÃO *in vitro* DA CEPA DE ORIGEM HUMANA MMC/Uni DE *Cryptosporidium* sp, EM CÉLULAS MDBK:

A manutenção *in vitro* da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, obtida de paciente portador de HIV/aids, foi realizada em lamínulas de vidro, que permitiam a formação das monocamadas de células MDBK, em meio de EAGLE – MEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), mais antibióticos e antifúngico. No momento da infecção a suplementação do SFB no meio de cultivo foi de 4%. Em todos os experimentos, as células eram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera de 85% de umidade, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>.

O tempo de cultivo das células para formarem monocamadas com 75% de confluência foi testado, desde 12 até 48 horas, tendo sido o de 12 horas o que apresentou maior durabilidade do tapete celular até o final do experimento, isto é, 90 horas de cultivo.

A concentração de oocistos purificados da cepa humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, em todos os experimentos, foi sempre igual a  $10^7$  em cada ml, tendo variado o volume entre 2 e 5ml. Essa variação de volume permitiu a utilização de número variável de lamínulas infectadas. Entretanto em todos os inóculos, o número de oocistos, submetidos ou não à excistação, foi sempre o mesmo, isto é,  $10^6$  por lamínula num volume final de 2 ml.

A cada 24 horas depois da infecção, as placas de cultivo eram retiradas da estufa e, logo em seguida, observadas em microscopia ótica de raios invertidos, com objetiva 40 x, para verificação de suas condições gerais e de contaminação. Em todos os experimentos, o tapete celular iniciava a aparentar degeneração logo após as primeiras 24 horas depois da infecção. A presença de contaminação por microorganismos também era freqüente a partir das primeiras horas depois da infecção das células.

Foram realizados protocolos de infecção da cultura com oocistos íntegros e excistados. Entretanto, preferiu-se a infecção das células MDBK com formas excistadas da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, porque nos experimentos em que utilizamos as formas excistadas, a aparência da monocamada celular, a partir de 24 horas depois da infecção foi melhor, apresentando maior aderência e menor concentração de microorganismos.

O tempo de cultivo das células infectadas para identificação dos estágios de desenvolvimento do *Cryptosporidium* sp variou de 48 até 90 horas, tendo sido o de 90 horas o único que apresentou formas de merontes do parasita.

Na Figura 4, estão demonstradas as formas de esporozoítos, os quais apresentam-se em formato de vírgula (Slides: A, B, C, D e E) e meronte, provavelmente Tipo II, contendo apenas 4 núcleos, ou merozoítos, em arranjo paralelo (Slide F) da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, que foram evidenciadas após 90 horas de cultivo em monocamadas das células MDBK, em meio de EAGLE-MEM, suplementado com 4% de Soro Fetal Bovino, e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob tensão de 5% de  $\text{CO}_2$  e 85% de umidade relativa, coradas pelo Giemsa, em microscopia ótica, sob imersão, com objetiva de 100 X.

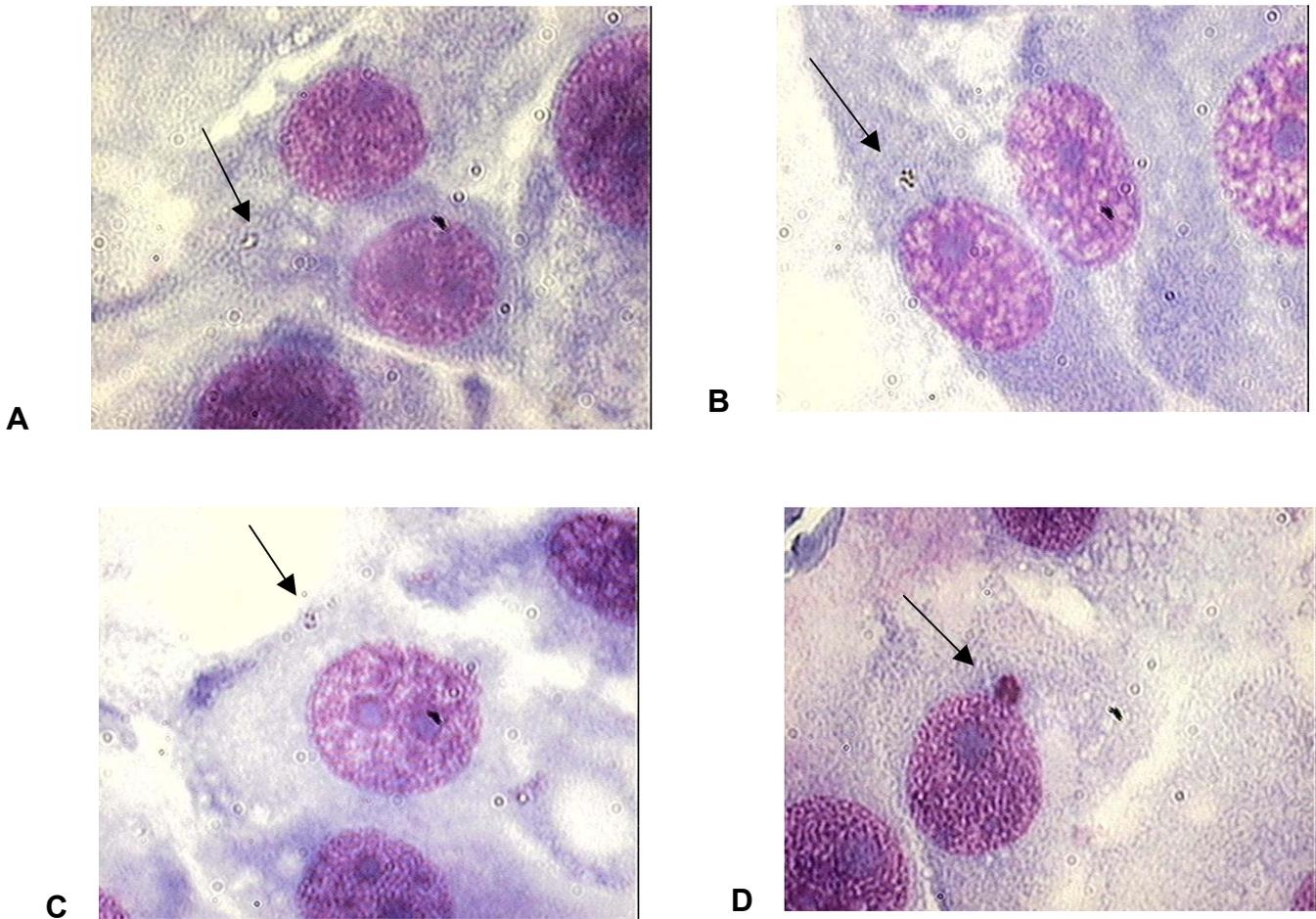


Figura 4 – Esporozoítos (Slides: A, B, e C) e meronte (Slide D) da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, em monocamadas de células MDBK após 90 horas de cultivo, em meio de EAGLE-MEM, suplementado com 4% de Soro Fetal Bovino, coradas pelo Giemsa, em microscopia ótica, sob imersão, com objetiva de 100 x.

#### 4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE *Cryptosporidium sp*, MMC/Uni:

Amostras da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium sp*, que foram congeladas a  $-90^{\circ}\text{C}$  em diferentes condições, apresentaram comportamentos diferentes no teste de infectividade *in vivo*, realizado individualmente com cada amostra, em camundongos SPF, neonatos da linhagem BALB/c/Uni.

A única amostra viável após os 10 meses de congelamento em “biofreezer”, foi aquela conservada com DMSO, pois somente nos lavados intestinais concentrados e purificados dos camundongos infectados com essa amostra foram evidenciados oocistos de *Cryptosporidium sp*, quando observados em microscopia de fase com objetiva 40 x, de acordo com o protocolo descrito em Material e Métodos.

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos e não tivesse amor,  
seria como o metal que soa, ou como o sino que tine.*

*Ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e a ciência e ainda que  
eu tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse todos os montes  
e não tivesse amor, nada seria...”*

**(Carta de São Paulo Apóstolo aos Coríntios, capítulo 13)**

## **5. DISCUSSÃO:**

A criptosporidiose humana é uma das várias patologias emergentes das últimas décadas do século passado, pois até os anos 70, a patogenia dessa infecção limitava-se ao aparecimento de doença diarréica de curta duração e de cura espontânea. Os fatores que contribuíram para isso ainda não estão perfeitamente definidos, pois são bastante complexos e dizem respeito, principalmente, às características do agente etiológico, dos vários hospedeiros e dos diversos ambientes. O caráter patológico desta infecção apareceu inicialmente no gado e posteriormente foi reconhecido seu caráter zoonótico, estabelecendo-se sua relação com pacientes portadores de aids, usuários de drogas imunossupressoras e crianças (CURRENT et al., 1983, MOSIER & OBERST, 2000 e TZIPORI & WARD, 2002).

Os primeiros casos de infecção humana só foram relatados na literatura a partir de 1976 (MEISEL et al. e NIME et al.), relacionando a gravidade da infecção ao “status” imunológico do hospedeiro. De fato, contrariamente ao que ocorre com os indivíduos imunocompetentes, os imunodeficientes, como os portadores do HIV, apresentam episódios diarréicos prolongados e graves, semelhantes aos do cólera, que lhes podem ser fatais (CDC, 1982). A partir de então, o número de publicações na literatura sobre a biologia, patogenia e epidemiologia do *Cryptosporidium* cresceu rapidamente e os avanços nas técnicas bioquímicas e de biologia molecular tornaram inevitável a descoberta de novas espécies, subespécies e linhagens desse parasito (FAYER et al., 2000 e FAYER, 2005).

*Cryptosporidium sp* está associado a doenças em pelo menos 79 espécies animais (MOSIER & OBERST, 2000) e tornou-se um problema globalizado, reconhecido desde os anos 90 (UNGAR et al, 1990). Sua patogenia mais comum e significativa é a doença entérica que acomete os mamíferos, principalmente o homem e os ruminantes.

O gênero *Cryptosporidium* inclui 16 espécies (CAREY et al., 2004; FAYER, 2005 e SUNNOTEL et al., 2006), dentre as quais sete são capazes de infectar os seres humanos, a saber: *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. suis*, *C. hominis* e *C. parvum*, o qual está mais tradicionalmente relacionado com o caráter zoonótico da infecção (CACCIÓ et al., 2005 e FAYER, 2005).

As infecções humanas por outras espécies de *Cryptosporidium*, além do *C. parvum*, têm sido relatadas com frequência menor. KATSUMATA et al. (2000), reportam uma provável infecção por *C. muris*, em duas meninas, com 4 e 5 anos de idade, saudáveis, na Indonésia, identificado morfológicamente após um teste negativo realizado por PCR específico para o *C. parvum*.

O *Cryptosporidium canis* (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2001a) e o *Cryptosporidium felis* (PEDRAZA-DÍAZ et al., 2001a e CACCIO et al., 2002) já foram relacionados com infecções em seres humanos. LALLO & BONDAN (2006) objetivando a determinação da prevalência de *Cryptosporidium* sp em cães, devido ao seu importante papel zoonótico, verificaram positividade apenas para o *C. parvum* numa prevalência de 8,8% (por microscopia ótica) e 9,5% (por PCR), na cidade de São Paulo.

O *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955), inicialmente descrito em perus, é a única espécie do gênero que infecta aves e mamíferos. Infecções humanas com *C. meleagridis* foram descritas por PEDRAZA DIAZ et al. (2000 e 2001b). AKIYOSHI et al., (2003) descreveram um isolado de *C. meleagridis*, de origem humana, que conseguiu infectar várias espécies de aves e mamíferos: suínos, camundongos, bovinos e pintainhos. A habilidade de uma espécie aviária do gênero *Cryptosporidium* infectar mamíferos tem um risco epidemiológico importante, não somente relacionado com a transmissão da infecção, mas também pela possibilidade da exposição a outras espécies de aves e de mamíferos.

Diferenças moleculares e biológicas, notadas entre os vários isolados de *C. parvum* que infectam animais diferentes, levou à descoberta dos dois genótipos principais envolvidos na infecção humana.

O primeiro, genótipo 1 ou "H" (abreviatura de "human"), antroponótico, capaz de infectar preferencialmente o homem (CARRAWAY et al., 1997 e PENG et al., 1997), mas podendo também ser detectado em outros animais (XIAO et al., 2004), foi descrito como uma nova espécie, o *Cryptosporidium hominis* (MORGAN-RYAN et al., 2002 e XU et al., 2004).

O segundo, genótipo 2 ou “C” (abreviatura de “cattle”), zoonótico, capaz de infectar uma grande variedade de mamíferos, dentre eles o homem, mas preferencialmente o gado, considerado como o *C. parvum* tradicionalmente conhecido, foi recentemente nomeado também como uma nova espécie, o *Cryptosporidium pestis* (SLAPETA, 2006). Entretanto, essa proposta gerou polêmica após sua publicação, pois XIAO et al. (2007), rebatem essa descoberta, alegando que o que era conhecido como genótipo bovino tem sido validado ao longo do tempo, pela medida do tamanho de seus oocistos, seu ciclo evolutivo e nos estudos sobre transmissão cruzada entre o gado e o camundongo, além do que essa nova nomenclatura não obedece ao Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. SLAPETA (2007), por sua vez, rebate esse argumento porque a nomenclatura do genótipo não precisa obedecer a normas e também porque desde seu descobrimento e até a atualidade “*C. parvum*” tem sido utilizado para nomear as inúmeras espécies do gênero *Cryptosporidium* que infectam o intestino dos mamíferos.

Além desses dois, existe atualmente uma grande variedade de genótipos de outras espécies de *Cryptosporidium*, entre os quais destacamos o genótipo do *C. muris*, descrito por HIKOSAKA & NAKAI (2005). WONG & ONG (2006), referem a presença de genótipo de cervídeo, isolado de humanos. Recentemente, NG et al. (2006), identificaram quatro genótipos aviários distintos.

PIENIAZEK et al., (1999) estudando os genótipos humanos obtidos de pacientes portadores de HIV, demonstraram total identidade entre eles e outros isolados de cães, bem como com o *C. felis*. Uma amostra de *C. parvum* isolada de coala apresentou genótipo distinto tanto dos isolados de bovinos, quanto dos isolados de humanos (MORGAN et al., 1997). GONÇALVES et al. (2006) utilizando métodos moleculares, referem pela primeira vez no Brasil a presença de um único genótipo de *C. hominis*, em amostras obtidas de um surto epidêmico em creche.

Na tentativa de deter essa corrida desenfreada para identificação de novas espécies de *Cryptosporidium*, que vem acontecendo nas duas últimas décadas, XIAO et al. (2004) propuseram critérios para sua denominação, que compreendem quatro componentes básicos, pelo menos: morfologia do oocisto, especificidade de hospedeiro natural (sítio de

desenvolvimento), caracterização genética e finalmente, obediência às normas internacionais de nomenclatura.

A análise morfométrica dos oocistos purificados da cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp MMC/Uni, realizada por ALVES et al. (2004) demonstraram que suas medidas: comprimento =  $4,91 \pm 0,44 \mu\text{m}$  e largura =  $5,85 \pm 0,35 \mu\text{m}$ , estão de acordo com as de *Cryptosporidium hominis*, descrito por CAREY et al. (2004). No entanto, o índice de forma, obtido da relação comprimento/largura, que foi de 0,84, diverge das observações de XIAO et al. (2004), que indica para o *C. hominis* índice de forma igual a 1,15, o que caracteriza uma forma mais esférica dos oocistos. Os oocistos de MMC/Uni, nos esfregaços, após concentração do material fecal, do paciente portador de HIV/aids estão demonstrados na Figura 1 (slides A, B e C).

A infecção humana causada pelo *C. hominis* tende a ser mais grave, com duração duas vezes maior do que a causada pelo *C. parvum* (BUSHEN et al., 2007). Raramente as duas espécies foram encontradas parasitando o mesmo hospedeiro, sendo igualmente agentes potenciais de contaminação por veiculação hídrica (FAYER, 2005 e CACCIÓ, 2005).

MOSIER & OBERST (2000) sugerem que um ambiente que abriga uma grande variedade de hospedeiros suscetíveis encontra-se predisposto para abrigar um elevado número de oocistos e facilitar a criptosporidiose em humanos e em animais. Os oocistos do ambiente podem ter as mais diversas origens; o gado doméstico, principalmente bovino e ovino, libera junto com suas fezes, grande quantidade de oocistos e, por essa razão, é considerado uma das principais fontes de contaminação do ambiente (MEINHARDT et al., 1997 e CASEMORE et al., 1997).

Animais domésticos de pequeno porte, como cães e gatos, não foram responsabilizados pela contaminação ambiental, apesar de relatos de incidência de 1,2% em gatos (SARGENT et al., 1998) e de 0-2%, em cães, conforme os dados descritos por CASEMORE et al., 1997. Aumento da concentração de oocistos no período das chuvas e em determinadas estações do ano contribui para o estabelecimento da correlação entre

sazonalidade e aumento da infectividade (ATHERHOLT et al., 1998). A transmissão por veiculação hídrica permanece como o principal problema de saúde pública em todo o mundo e há a necessidade urgente da elaboração de novos protocolos para caracterização do parasita, incluindo genotipagem, cultivo em células e desinfecção para que o desejado controle da infecção seja atingido.

Sob o ponto de vista de AKIYOSHI et al. (2003), existe uma imediata necessidade para a padronização de pesquisa com isolados referenciados que afetem seres humanos, para que sejam mantidos em animais “germfree”, para prevenir contaminação com outros isolados do ambiente ou do próprio laboratório. A propagação de isolados bem caracterizados, representando várias espécies de *Cryptosporidium* que estejam livres de possíveis contaminações, particularmente aquelas infecciosas para os humanos, contribuirá para o melhor entendimento da infecção e para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e terapias mais eficazes e conseqüentemente para seu controle.

A manutenção de linhagens do parasita em ambiente isolado e em animais saudáveis, previne contaminação cruzada com isolados do ambiente e dos próprios animais do laboratório. A colônia de camundongos SPF no CEMIB/UNICAMP foi avaliada periodicamente para diagnóstico de vírus, bactérias e parasitas, no seu Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária (GILIOLI et al., 1996 e 2000).

A cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foi mantida em camundongos livres de patógenos específicos, certificados pelo Controle Sanitário de uma Instituição de renome Internacional na produção de animais para experimentação o CEMIB/UNICAMP, além do que durante o todo o tempo que durou os experimentos, todos os animais foram mantidos em unidades isoladoras, no Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

Esta metodologia assegurou a presença exclusiva do *Cryptosporidium* sp da cepa de origem humana MMC/Uni em todos os animais adotados durante os experimentos.

Diferenças na distribuição geográfica de vários isolados do *C. parvum* têm sido reconhecidas (MORGAN et al., 1995 e CARRAWAY et al., 1996). Entretanto também foram encontradas diferenças entre isolados de *C. parvum* obtidos de fezes bovinas coletadas em

áreas geográficas limitadas (SHIANNNA et al., 1998). Essa heterogeneidade, portanto, parece refletir mais precisamente a heterogeneidade dos próprios isolados do *Cryptosporidium* sp do que as diferenças geográficas propriamente ditas.

Ensaio experimentais realizados por CARRAWAY et al. (1997), demonstraram que podem acontecer mudanças genóticas nos isolados de *C. parvum*, após transmissão entre hospedeiros de espécies distintas. Esses autores evidenciaram mudanças do genótipo bovino para o genótipo humano em amostras de *C. parvum*, isoladas de dois pacientes portadores do HIV, após passagem em humanos.

Também já foram detectadas diferenças na suscetibilidade de hospedeiro entre dois isolados de *Cryptosporidium andersoni*, uma espécie descoberta no gado bovino doméstico (LINDSAY et al., 2000), a qual originalmente não foi capaz de infectar camundongos. Entretanto, MATSUBAYASHI et al. (2005) referem um novo isolado de *C. andersoni* no Japão, o qual é geneticamente idêntico ao isolado original, mas que causa infecção em murinos.

*Cryptosporidium hominis* está geralmente presente nas infecções humanas de áreas urbanas, enquanto que o *Cryptosporidium parvum* se restringe às áreas rurais (LEARMONTH et al., 2004). Este mesmo trabalho refere-se à periodicidade da infecção segundo as estações do ano, quando as infecções de caráter zoonótico acontecem na primavera e as de caráter antroponótico, no outono. Ficou também estabelecida a diversidade dentro do próprio gênero, pois nesse estudo foi detectada a presença de uma nova espécie de *Cryptosporidium*, cuja sequência de DNA é bastante semelhante à do *C. canis*, em duas crianças procedentes de regiões distintas e sem qualquer relação uma com a outra.

Modelos animais, que reproduzam a infecção humana têm sido objeto de constantes pesquisas. 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 com a resposta imune humoral comprometida pelo tratamento com soro anti-linfócitos CD4 ou CD8 (UNGAR et al., 1990), camundongos portadores de deficiência

imunológica grave, ditos *scid* (MEAD et al., 1991), bem como aqueles tratados geneticamente para não produzirem Interferon Gama, referidos como *KO* (MEAD & YOU, 1998).

RASMUSSEN & HEALEY (1992), utilizando protocolos de infecção em camundongos adultos imunossuprimidos de várias linhagens isogênicas, detectaram que apenas a linhagem C57BL/6N desenvolveu criptosporidiose crônica. PETRY et al. (1995) e YANG et al. (2000) também sugerem esta mesma linhagem imunossuprimida para propagação de oocistos e genotipagem ou clonagem do parasita, respectivamente.

ENRIQUEZ & STERLING (1991) num teste para escolha de um modelo animal apropriado para o estudo da criptosporidiose, utilizando 17 linhagens de camundongos com 12 padrões genéticos distintos (diferentes haplotipos), detectaram apenas em uma delas, imunodeficiente em células NK, um número significativo de parasitas. Esta mesma característica, de deficiência de células NK, caracterizou a linhagem de camundongo, C57BL/6/*bg*, que foi utilizada no primeiro experimento de êxito na infecção de camundongos com a cepa de origem humana MMC/Uni.

A manutenção da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp “*in vivo*” foi inicialmente realizada em camundongos neonatos de linhagens imunocompetentes: heterogênicas como o Swiss/Uni, ou isogênicas tais como, A/Uni, BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, DBA/2 e SJL; e imunodeficientes isogênicos, como CBA/Uni/*xid*, CB-17/Uni/*scid* e C57BL/6/Uni/*bg*. Posteriormente, a partir de novembro de 2004, depois de seu estabelecimento em camundongos neonatos de diversas linhagens, a cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, obtida de paciente portador de HIV/aids (BRITTO et al., 2000), começou a ser cultivada *in vivo* em camundongos adultos imunodeficientes da linhagem C57BL/6/*KO* para Interferon Gama. Esses camundongos infectam-se com poucos oocistos de *Cryptosporidium* sp e parecem imitar a infecção humana, pois desenvolvem vários sintomas clínicos característicos, dentre eles a perda de peso (ALVES et al., 2004).

Nas primeiras tentativas de infecção de camundongos com este novo isolado, a mortalidade dos animais chegou a 100%, antes mesmo de completar 72 horas depois da infecção. Na primeira infecção de êxito, em dezembro de 1999, a mortalidade foi de 80%,

em 72 horas. Na infecção posterior, a mortalidade dos animais chegou a 50%, no mesmo intervalo de tempo. Em nosso entendimento, a grande virulência do inóculo está justificada provavelmente porque a cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp é uma espécie parasita adaptando-se a um hospedeiro diferente. No final da primeira etapa de manutenção de MMC/Uni, realizada em camundongos neonatos, já haviam sido realizadas 57 passagens nesse modelo experimental.

O protocolo de manutenção da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp em camundongos neonatos, como se encontra descrito neste trabalho, requer persistência e grande disponibilidade de animais, além de habilidade para o seu manuseio face ao reduzido tamanho dos animais. Talvez sejam esses os motivos da falta de dados na literatura a respeito do cultivo *in vivo* de *Cryptosporidium* sp nesse modelo experimental. Nesta primeira etapa de manutenção foram utilizados 1232 camundongos neonatos.

A segunda etapa de manutenção da cepa de *Cryptosporidium* sp, MMC/Uni, de origem humana foi realizada em camundongos adultos da linhagem C57BL/6/KO para Interferon Gama, no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2004 (ALVES, 2004). Nesta etapa, que correspondeu a 15 meses, foram realizadas 11 passagens e utilizados 53 animais atendendo ao princípio dos 3 “R” (“refinement”, “reduction” and “replacement”), um dos mais importantes requisitos na Ética e bem estar Animal.

Até fevereiro de 2004 a cepa de *Cryptosporidium* sp de origem humana, MMC/Uni, encontrava-se na 68ª passagem em camundongos, das quais as últimas (11) foram realizadas em animais adultos da linhagem C57BL/6/KO para Interferon Gama e, até esse prazo, haviam sido utilizados 1285 animais de diferentes linhagens, tanto heterogênicas, como isogênicas; neonatos ou adultos, imunocompetentes e imunocomprometidos. Os dados dos números de passagens e dos números de animais aqui descritos, não estão de acordo com os revistos por ALVES (2004), porque a referida autora não considerou a 1ª passagem, quando o material humano foi introduzido pela primeira vez em 20 camundongos.

Convém ressaltar que quaisquer neonatos que foram infectados durante todos os experimentos, correspondiam àqueles que eram excedentes da colônia do CEMIB,

resultantes do processo de seleção denominado “culling” e seriam sacrificados na colônia até o terceiro dia de idade. Houve ainda o cuidado para a seleção de algumas mães, no último parto, que os acompanhavam no experimento dentro de isoladores, para garantia de aleitamento dos filhotes.

A infecção pelo *Cryptosporidium* é mais grave nos animais jovens e, na tentativa de explicar esse fato, THEA et al. (1992) e JOE et al. (1994), referem que existem lectinas na superfície dos esporozoítos as quais podem mediar as ligações desse organismo aos carboidratos específicos da mucosa intestinal, cuja composição pode ser alterada, entre outros fatores, pela idade (SRIVASTANA et al., 1987). A imaturidade imunológica, relacionada com a idade, pode também influenciar a suscetibilidade para a infecção (RIGGS, 1997).

Os efeitos devastadores da infecção pelo *Cryptosporidium* nos pacientes e nos modelos animais imunocomprometidos indicam o importante papel da imunidade no controle da criptosporidiose. Respostas imunes mediadas por células, têm demonstrado excelente desempenho na prevenção e resolução da infecção (UNGAR et al., 1991; URBAN et al., 1996 e RIGGS, 1997). MARTINEZ et al. (1992), num modelo de cultivo *in vitro*, demonstraram a persistência de formas assexuadas do parasito em cultura de macrófagos, evidenciando uma forma de escape deste parasito da degradação lisossomal.

ALVES (2004) analisando a evolução da infecção experimental pelo *Cryptosporidium sp*, obtido de paciente portador de HIV (BRITTO et al., 2000), em linhagens de camundongos SPF imunodeficientes, evidenciou a necessidade das células T, NK e do Interferon - Gama, para a resistência à infecção.

Embora a resposta imune humoral pareça ter pouca importância (TAGHI-KILANI et al., 1990), a administração de colostro bovino hiperimune reduziu no gado o período da infecção e o número de oocistos liberados nas fezes, além da severidade da diarreia (RIGGS, 1997). WALTERS et al. (2000) em experimentos utilizando como modelo experimental uma linhagem de camundongo deficiente de células B, demonstraram que esse linfócito é necessário para a indução das lesões inflamatórias no intestino. Também

DOYLE et al. (1993) utilizando um modelo de cultivo *in vivo* de *C. parvum*, avaliaram a modulação do ciclo evolutivo deste parasita, mediada por anticorpo.

RIGGS (2002) e SINGH et al. (2005) referem que a resposta imune dos hospedeiros contra *Cryptosporidium* sp são mediadas por anticorpos e mais particularmente pelos Linfócitos T, pois foram detectados níveis elevados de Interleucinas e Interferon Gama durante os estágios iniciais da infecção.

Quando o modelo animal de manutenção *in vivo* para a cepa de *Cryptosporidium* sp MMC/Uni, obtido de paciente portador de HIV/aids, foi testado em várias linhagens de camundongos, tanto imunocompetentes heterogênicas ou isogênicas, quanto imunodeficientes isogênicas, não houve quaisquer diferenças na suscetibilidade dessas linhagens à essa cepa. Também não foram observadas diferenças em relação à mortalidade dos animais e ao número de oocistos obtidos depois dos processos de purificação.

O cultivo *in vitro* do gênero *Cryptosporidium* avançou significativamente nestes últimos anos. Estes parasitas celulares obrigatórios, que colonizam o epitélio do trato digestivo e freqüentemente do trato respiratório, são muito difíceis de obter em quantidade suficiente a partir de seus hospedeiros naturais. Ao lado disso, métodos de pesquisa apoiados estritamente no uso de modelos animais entram em confronto direto com os protocolos de Ética em Experimentação Animal. Assim como um modelo experimental animal ainda não está definido, também não se encontram estabelecidas a metodologia de cultivo contínuo e a definição de uma linhagem celular onde o ciclo biológico do parasito seja completado.

MARTINEZ et al. (1992) num modelo de cultivo de *C. parvum*, em macrófagos não sensibilizados, demonstraram a habilidade deste parasita de infectar células não epiteliais. WIEST et al. (1993), utilizando protocolo de infecção de células de adenocarcinoma humano, HT29.74 por um isolado humano de portador de HIV/aids, mantido em Dicromato de Potássio, evidenciaram a importância dos microtúbulos na invasão das células do hospedeiro e desenvolvimento do *C. parvum*. Ensaio realizado em células epiteliais da linhagem T84, infectadas com um isolado bovino, foram indicativos de

que o *C. parvum* realmente rompe a barreira de células epiteliais e não, simplesmente, abre canais através delas, como se pensava anteriormente (ADAMS et al., 1994). Consistente com as observações de WIDMER et al. (2000) de que o cultivo de *C. parvum* em monocamadas induziu apoptose, recentemente alguns autores demonstraram uma infecção maior em células que estavam sofrendo processo de divisão (WIDMER et al., 2006).

A manutenção *in vitro* da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium sp*, obtida de paciente portador de HIV/aids, foi realizada em células MDBK. Embora desde 1994 a linhagem celular de adenocarcinoma humano, HCT-8, já tivesse sido escolhida como a melhor para o cultivo do *Cryptosporidium parvum*, independente do genótipo do isolado escolhido para a infecção (UPTON et al., 1994b), TZIPORI (1998), refere que esta mesma linhagem celular, HCT-8, possui uma fluorescência própria, o que inviabilizava seu uso, visto que nosso protocolo experimental inicial pretendia verificar a presença desses parasitos no interior da célula pela técnica de Imunofluorescência Direta.

O completo desenvolvimento de *C. parvum* em células MDBK está descrito por VILLACORTA et al. (1996), que sugerem a suplementação do meio de cultivo com insulina, glicose e vitaminas, para obtenção de maior número de parasitas.

Durante a infecção das células MDBK, a cepa de origem humana de *Cryptosporidium* MMC/Uni foi cultivada em EAGLE-MEM, o qual é composto principalmente de altas concentrações de aminoácidos, que estão presentes na grande variedade de proteínas de mamíferos e que facilitam o desenvolvimento de suas células em cultura, além de vitaminas. A composição do EAGLE-MEM está descrita no Anexo II.

Até o presente não foi estabelecido um sistema de propagação contínua de *Cryptosporidium sp* em cultivo celular (PETRY, 2004). A dificuldade da propagação deste parasita *in vitro* pode ser resultante da falta de nutrientes, ou de condições que dificultem a morte da célula hospedeira ao longo da infecção (ROCHELLE et al., 2002). HIJJAWI et al. (2004), que descreveram o desenvolvimento completo do genótipo bovino de *Cryptosporidium*, fora da presença de células hospedeiras, utilizaram o meio RPMI acrescido de soro de bezerro recém-nascido.

MMC/Uni foi cultivada com EAGLE-MEM suplementado com 4% de soro fetal bovino, para impedir o crescimento exagerado das células e conseqüentemente a degeneração das monocamadas celulares (HIJJAWI et al., 2001).

HIJJAWI et al (2001) referem que o genótipo bovino é menos agressivo para o cultivo celular e ainda mais, que o ciclo biológico do parasita originado da infecção celular com o genótipo bovino foi de 120 horas pós-infecção (p.i.), contra as 72 horas que foram observadas quando o cultivo foi realizado com o genótipo humano, o qual também apresentava-se mais agressivo para a célula hospedeira.

A cada 24 horas durante o cultivo de MMC/Uni o aspecto das monocamadas de MDBK foi observado e verificou-se desde as primeiras 24 horas p.i. o desprendimento do tapete celular, bem como a presença de sujidades e contaminantes microbiológicos, sugerindo um inóculo agressivo. Alguns autores (HIJJAWI et al., 2001) referem que mudanças de pH exercem um importante papel na manutenção do crescimento deste protozoário *in vivo*. MMC/Uni foi mantida em cultivo com tampão PBS 0,01M, pH 7.2 a 7.4. A escolha do tempo de cultivo em aproximadamente 90 horas deu-se em face de que este foi o período máximo conseguido para a aderência das células MDBK infectadas nas lamínulas.

Após 90 horas do cultivo da cepa de origem humana de *Cryptosporidium* sp, MMC/Uni, em células de rim bovino (MDBK), foi possível demonstrar a presença de merontes, provavelmente Tipo II, porque apresentam apenas quatro merozoítos, em arranjo paralelo (Figura 4, slide D), sugerindo que a realização do ciclo biológico completo dessa cepa referida fosse de longa duração.

Alguns autores têm referido na literatura períodos de tempo inferiores de cultivo, quando relatam a obtenção de várias formas características tanto do ciclo de reprodução assexuada, quanto sexuada. Nos ensaios de cultivo da cepa de origem humana MMC/Uni, de *Cryptosporidium* sp, só foram evidenciadas formas assexuadas do parasito, mesmo após 90 horas do seu cultivo *in vivo*. Talvez as formas sexuadas, ou mesmo os oocistos não tenham sido evidenciados na cultura por causa do método escolhido para sua identificação, feita pela observação das monocamadas de células MDBK infectadas,

lavadas, fixadas e coradas pelo Giemsa, em microscopia ótica com objetiva 100 x, por imersão. Fato intrigante para consideração é que diversos autores, que referem a identificação de várias formas do ciclo biológico do parasito, não fornecem em seus artigos publicados, qualquer registro desses achados, como por exemplo, as imagens.

Inicialmente a técnica escolhida para identificação dos diferentes estágios do ciclo biológico da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, durante o cultivo celular em monocamadas foi a Imunofluorescência Direta e para sua realização foram importados dois reagentes, visto que na época não estavam disponíveis no mercado nacional. O primeiro, para a identificação de estágios reprodutivos intracelulares do parasita, o Sporo-Glo (WATERBORNE™, INC. New Orleans, LA, USA) e o segundo, o Crypt-a-Glo (WATERBORNE™, INC. New Orleans, LA, USA), para evidencição dos oocistos.

Embora os protocolos para a utilização de ambos tivessem sido seguidos à risca, acrescidos da utilização de controles que acompanhavam ou não os kits, nenhum resultado foi possível, devido à inespecificidade de ambos, que apresentavam fluorescência positiva nas membranas de todas as células, bem como de todas as estruturas intracelulares, não importando se as células estavam infectadas ou não (dados não mostrados).

A demonstração da presença de esporozóitos e merontes do *Cryptosporidium* sp de origem humana, MMC/Uni foi realizada pela observação em microscopia ótica, sob imersão, com objetiva 100 X, das monocamadas de MDBK, infectadas, após 90 horas de cultivo em EAGLE-MEM, suplementado com 4% de soro fetal bovino, fixadas em Acetona e coradas pelo Giemsa.

O processo de excistação de oocistos de *Cryptosporidium* ainda está pouco compreendido. Entretanto, alguns estudos (GOLD et al., 2001; SMITH et al., 2005; FENG et al., 2006a e 2006b) demonstraram que sua infectividade na cultura de células aumenta quando excistado e sugerem tratar-se de um recurso baseado em fenômenos que mimetizam eventos que acontecem no micro ambiente do trato digestório do hospedeiro e por esta razão, o pH ácido, a temperatura de 37°C, a incubação com sais biliares, o tempo de excistação e a presença de agentes redutores e proteases, desempenham um papel

importante na transdução de sinais externos para a ativação e mobilidade dos esporozoítos, facilitando sua penetração na célula do hospedeiro.

VILLACORTA et al. (1996) relatam que os oocistos de *Cryptosporidium* que se rompem no momento da infecção das células na cultura, liberam substâncias tóxicas no meio, prejudicando a fixação do tapete celular. Contudo, alguns autores referem uma quantidade significativamente maior de formas do parasito, recolhidas no sobrenadante da cultura, quando a infecção é feita com oocistos íntegros (MAILLOT et al., 1997) e mais, que a viabilidade dos esporozoítos diminui quando manipulados fora dos oocistos (UPTON et al., 1994b).

Neste trabalho, foram realizados experimentos de infecção de células com inóculos de oocistos íntegros e excistados. Nos experimentos de infecção com oocistos íntegros, as monocamadas celulares aparentavam-se mais contaminadas e menos aderentes, logo nas primeiras horas depois da infecção. Entretanto, quando a cultura foi infectada com oocistos tratados com sais biliares, para sua excistação, o tapete celular aparentou-se mais aderente e com menos contaminantes, no mesmo período. Portanto, para a manutenção da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium sp* "in vivo", as monocamadas das células MDBK foram infectadas com esporozoítos livres. Com a finalidade de assegurar a capacidade infectante dessas formas do parasito, pela sua manipulação fora dos oocistos, logo após os procedimentos de excistação, procedia-se à infecção das lamínulas, considerando apenas a concentração inicial dos oocistos depois dos processos de purificação, de modo que os esporozoítos não foram enumerados.

Também foi observado que a formação das monocamadas nas lamínulas para a obtenção de 75% de confluência, ocorria após o repique das células MDBK em EAGLE-MEM, suplementado com SFB a 10% e soluções antibiótica e antifúngica, entre 12 e 24 horas e escolhemos o tempo do preparo das células para a infecção de 12 horas, pois este período permitiu maior durabilidade da aderência do tapete, no tempo mais longo de cultivo obtido, que foi o de 90 horas.

A infecção pelos parasitos do gênero *Cryptosporidium* inicia-se através da ingestão de oocistos presentes no ambiente, portanto, o controle desse estágio parasitário é o fator mais importante na limitação de sua expansão. Uma grande variedade de desinfetantes têm sido utilizados para o controle dos oocistos liberados no ambiente pelo homem e outras tantas espécies animais, já aqui referidas. Os métodos de desinfecção e esterilização tradicionais muitas vezes não são eficazes contra o *Cryptosporidium*.

Os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes à dissecação e a muitos desinfetantes iodados, clorados, cresílicos e mesmo ao formol a 5%. O mais indicado para destruí-los é a utilização de Amônia a 50%, ou Formalina a 10% por 30 minutos ou ainda, aquecimento a 60°C por 30 minutos ou a 100° C por 1 minuto (CASEMORE et al., 1997 e BARBEE et al., 1999). Entretanto, esses agentes têm demonstrado pouco efeito na infectividade do parasita. Comprovadamente, a destruição total do parasita só acontece quando se tomam medidas extremas e impraticáveis, como por exemplo, luz ultravioleta, formalina e amônia, em altas concentrações, pois colocam em risco a integridade dos seres vivos.

Quando os experimentos de passagens seriadas semanais da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foram interrompidos, as amostras brutas, que receberam apenas os tratamentos iniciais para purificação, como maceração e filtração, foram acondicionadas em solução de Dicromato de Potássio a 2,5% e conservadas a 4°C, por períodos que variaram de 4 até 16 meses. Testes de infectividade de MMC/Uni *in vivo*, realizados em camundongos neonatos foram realizados depois de cada um desses períodos e foi demonstrada sua infectividade após 16 meses de conservação nas condições já referidas.

ARROWOOD (2002) refere-se à conservação de oocistos de *Cryptosporidium* em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%, entre 4 e 8°C, por um período superior a 6 meses. FAYER (2005) repta-se à viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, quando conservados em água deionizada a 0, 5, 10, 15 e 20°C, por 6 meses; a 25 e 30°C,

por 3 meses e a 35°C, por apenas uma semana. JENKINS (2003), refere viabilidade de oocistos de *C. parvum*, conservados em água esterilizada a 15°C, por 7 meses.

Embora os oocistos de *Cryptosporidium* possam sobreviver no ambiente por vários meses em baixas temperaturas, FAYER (2005) refere que amostras congeladas a -70°C, por 1 hora e outras congeladas a -20°C, por 24 horas, falharam em infectar camundongos; entretanto, quando o congelamento foi a -20°C, por 8 horas, assim como a -10°C, por mais de 168 horas, teve êxito a infecção experimental de camundongos. A alíquota da cepa humana de *Cryptosporidium sp*, MMC/Uni, mantido em camundongos, quando preservado com DMSO (10%) por 10 meses, em congelador a -70°C, permaneceu infectante, sugerindo a ação crioprotetora do DMSO.

Os testes *in vitro* de viabilidade de MMC/Uni em DAPI não forneceram qualquer indício de que a amostra que foi congelada com DMSO tivesse mantido sua integridade (dados não mostrados); entretanto, os testes *in vivo* de infecção de camundongos neonatos, da linhagem imunocompetente BALB/c/Uni, mostraram-se positivos. Convém ressaltar que o corante fluorogênico DAPI, assim como a maioria dos métodos químicos, oferece subsídios para observação apenas da morfologia dos oocistos (CANTÚSIO NETO, 2004). BLACK et al. (1996) realizaram a medida da viabilidade dos oocistos de *C. parvum* após tratamentos químicos variados e comprovaram que vários desses métodos subestimam a viabilidade, sugerindo que os testes de infectividade *in vivo* constituem a medida mais precisa. Também BUKHARI et al. (2000) consideram que os testes de infectividade *in vivo* são a metodologia padrão para os ensaios de infectividade de *Cryptosporidium*.

As metodologias aqui apresentadas permitiram a elaboração de protocolos para manutenção da infectividade de uma cepa de *Cryptosporidium sp*, obtida de um único paciente portador de HIV/aids, MMC/Uni, em camundongos neonatos de linhagens isogenéticas ou heterogenéticas, imunocompetentes ou imunodeficientes, livres de patógenos específicos e de contaminação ambiental. MMC/Uni também foi capaz de infectar monocamadas celulares, permitindo a demonstração, após 90 horas de cultivo, de formas assexuadas (merontes) do ciclo biológico do parasita.

*“O tempo é um mestre de cerimônias  
que sempre acaba por nos pôr no lugar que nos compete.  
Vamos avançando, parando e recuando às ordens dele,  
o nosso erro é imaginar que podemos trocar-lhe as voltas.”*

**Fernando Pessoa**

## **6. CONCLUSÕES:**

1. MMC/Uni é uma cepa de *Cryptosporidium* sp, obtido das fezes de um único paciente portador de HIV/aids.
2. A cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foi capaz de infectar camundongos livres de patógenos específicos, neonatos com 1 a 4 dias de idade, de linhagens imunocompetentes, heterogênicas ou isogênicas e imunodeficientes isogênicas, mantidas em unidades isoladoras.
3. Foi possível estabelecer a manutenção do cultivo *in vivo* da cepa humana, MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp, em camundongos livres de patógenos específicos, neonatos com 1 a 4 dias de idade, de linhagens imunocompetentes, heterogênicas ou isogênicas e imunodeficientes isogênicas, mantidas em unidades isoladoras.
4. A cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp foi capaz de infectar células de rim bovino.
5. Após 90 horas do cultivo da cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp na linhagem celular MDBK foi possível constatar a presença de merontes.
6. A cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp permaneceu infectante após 16 meses, sob refrigeração a 4°C, em solução de Dicromato de Potássio a 2,5%.
7. A cepa de origem humana MMC/Uni de *Cryptosporidium* sp permaneceu infectante para camundongos neonatos após 10 meses de congelamento em DMSO a -70°C.

*“E’ preciso amor, para poder pulsar,  
E’ preciso paz, para poder sorrir,  
E’ preciso chuva, para florir..”*

**Almir Sater**

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, R.B.; GUERRANT, R.L.; ZU, S.X.; FANG, G.D.; ROLHE, J.K. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium : morphologic and function studies in an "in vitro" model. **Journal of Infectious Disease**, v. 169, p. 170-177, 1994.

AGNEW,D.G.; LIMA, A.A.; NEWMAN, R.D.; WUHIB,T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. **Journal of Infectious Disease**, v.177, p.754-760,1998.

AKYOSHI, D.E.; DILO,J.; PEARSON, C.;CHAPMAN, S.; TUMWINE, J.; TZIPORI, S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. **Infection and Immunity**,v. 71, p. 1828-1832, 2003.

ALVES, DP.; BRITTO. M.H.S.S ; GUARALDO, A.M.A. Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes: dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p.55-60, 2004.

ALVES, DP. Infecção pelo *Cryptosporidium* sp, linhagem humana MMC, em camundongos C.B - 17/Uni scid, C57BL/6/Uni bg, C31-1/Uni nu e C57BL/6 KO para INF-y.Tese de Doutorado do Instituto de Biologia da Unicamp., Campinas, 126p, 2004.

ARROWOOD, M. J. Diagnoses. **In: Cryptosporidium** and Criptosporidiosis. (Fayer, R., Ed.), CRC Press Boca Raton, Florida, 288 pp.,1997.

ARROWOOD, M. J.; MEAD, J. R.; MAHRT, J. L.;STERLING, C. R. Effects of immune colostrum and orally administered antisporozone monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. **Infection and Immunity**, v.57,p.2283-2288, 1989.

ARROWOOD, M. J.. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. **Clinica) Microbiology Review**, v. 15, p. 390-400, 2002.

ATHERHOLT, T.B.; LE CHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. ; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Journal of American Water Works** , v. 90, p. 66-80, 1998.

BAGLEY, S.T.; AUER, M.T.; STERN, D.A.; BABIERA, M.J. Sources and fact of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in surface waters. **Journal of Lake Research Management**, v. 14, p. 379-392,1998.

BARBEE, S.L.; WEBER, D.J.; SOBSEY, M.D.; RUTALA, W.A. Inactivation of and *Cryptosporidiosis* (Fayer, R., *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 49, p. 605-611, 1999.

BLACK, E. K.; FINCH, G. R.; TAGHI-KILANI, R.; BELOSEVIC, M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Letters**, v. 135 ,p.187-189, 1996.

BLAGBURN, B. L.; SOAVE, R. Prophylaxis and Chemotherapy. In: *Cryptosporidium* Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 288pp., 1997.

BLANSHARD, C.; JACKSON, A M.; SHANSON, D.C.; FRANGIS, B.G. ; GAZZARD. *Cryptosporidiosis* in HIV seropositive patients. **Quarterly Journal of Medicine**, v.85, p.813-23,1992.

BONIN, A.; LAPILLONE, A.; PETRELLA, T.; LOPEZ, J.; CHAPONNIER,C.; GABBIANI, G.; ROBINE, S.; DUBREMETZ, JF. Immunodetection of the microvillous cytoskeleton molecules villin and ezrin in the parasitophorous vacuole wall of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). **European Journal of Cell Biology**,v. 78,p. 794-801, 1999.

BONNIN,A.;SALIMBEN1,I.;DUBREMETZ,J.F.;HARLY,G.;CHAVANET,P.; CAMERLYNCK, P. Mise au point d'un modèle experimental de cultura *in vitro* das stades asexués de *Cryptosporidium* sp. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee** , v. 65, p. 41-43, 1990.

BRANCO, N. Avaliação da Presença de *Cryptosporídium* spp. e *Giárdia* spp. em Águas Minerais Naturais de Nascentes e Enteroparasitoses em duas Comunidades Rurais da Cidade de Campos do Jordão, S P, Brasil. **Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas**, 113 pp., 2006.

BRITTO, M. H. S. S.; ALVES, D.P.; FREITAS, F. F. T.; GUARALDO, A. M. A. Isolamento de *Cryptosporídium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado humano em camundongos. Livro de resumos do VII Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório e 111 Congresso Mundial da Ciência de animais de Laboratório, Campinas, SP, 3 a 6 de dezembro, p. 44, 2000.

BUSHEN, O.Y.; KOHLI A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK, K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporídium hominis* and *Cryptosporídium parvum*. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v.101,p.378-384,2007.

CACCIÒ, S.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO,E. Human infection with *Cryptosporídium felis*: case report and literatura review. **Emergent Infectious Diseases**. v. 8, p. 85-86, 2002.

CACCIÓ, S. M. Molecular epidemiology of human Cryptosporidiosis. **Parassitologia**, v. 47,p. 185 - 192, 2005.

CACCIÓ, S. M.; ANDREW THOMPSON, R. C.; Mc LAUHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, p. 430-437, 2005.

CANTÚSIO NETO, R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil **Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas**, 88 pp.,2004.

CAREY, C.M.; LEE, H. ; TREVORS, J.T. Biology persistente and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v.38, p.818-862, 2004.

CARRAWAY, M.; TZIPORI, S. ; WIDMER, G. A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3958- 3960, 1997.

CARRAWAY, M; TZIPORI, S.; WIDMER, G. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. **Applied Environmental Microbiology**. v. 62, p.712-716,1996.

CASEMORE, D.P.; WRIGHT, S.E.; COOP, R.L.. Human and animal epidemiology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. (Fayer, R., Ed.), CRC Press. Boca Raton, 288 pp., 1997.

Centers for Disease Control and Prevention <http://www.cdc.gov> consulta junho/2005

Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic notes and reports Cryptosporidiosis: Assesment of chemotherapy of males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). MMWRv.31,p. 589-592, November 12, 1982.

CHAPPELL, P.; OKHUYSEN, C.; STERLING, C.; WANG, C.; JAKUBOWSKI, W. DuPONT, H. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with preexisting anti-*C. parvum* IgG. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**.v. 60, p.157-64,1999.

CIMMERMAN, S.; CIMMERMAN, B ; LEWI, D.S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **International Journal of Infectious Disease.**, v. 3, p. 203-206, 1999.

CLAVEL, A.; ARNAL, A. C.; SÁNCHEZ, E. C.; CUESTA, J.; LETONA, S.; AMIGUET, J. A.; CASTILLO, F. J.; VANEA, M.; GÓMEZ-LUS, R. Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literatura. **Infection** , v.211, p. 341-346, 1996

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S..Cryptosporidiosis. **Clinica) Microbiology Review** v.4, p.325-358,1991.

CURRENT, W.L.; HAYNES, T.B. Complete development of *Cryptosporidium* in cell cultura. **Science** , v.224,p.603-605. 1984.

CURRENT, W. L. N.; REESE, N. C.; ERNST, J. V.; BAILEM, W. S.; HEYMAN, M. B. ; WEINSTEIN, M. D. Human Cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persosn: studies of an outbreak and experimental transmission. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 1252-1257, 1983.

CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: J. P. DUBEY; C. A. SPEER ; R. FAYER (Ed.) **Cryptosporidiosis of mau and animais**. CRC Press, Boca Ratón, Fia. p 44-77, 1990.

CURRENT, W.L ; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinica) Microbiology Reviews**. v.4, p. 325-358., 1991.

CURRENT, W.L. ; HAYNES, T.B. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. **Science**, v. 224, p. 603-605,1984.

CURRENT, W.L; LONG , P.L. Development of human and calf *Cryptosporidium* in ckichen embryos. **Journal of Infectious Disease**, v. 148, p. 1108-1113,1983.

CURRENT, W.L. ; REESE, N.C. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 98-108, 1986.

DANN, S. M.; WANG, H. C.; GAMBARIN, K. J.; ACTOR, J. K.; ROBINSON, P.; LEWIS, D. E.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; WHITE, A. C. Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan *Cryptosporidium*. **Journal of Infectious Disease**, v.192,p. 1294-302, 2005.

DATRY, A., DANIS, M; GENTILINI, M. Développement complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire: applications. **Médecine Science**,v. 5, p.762-766, 1989.

DEITZ, V. J. ; ROBERTS, J. M. National surveillance for infection with *Cryptosporidium parvum*, 1995-

1998: what have we learned? **Public Health Rep.** v.1 15,p. 358-63, 2000.

DOYLE, P.S.; CRABB, J.; PETERSEN,C..Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4079-4084,1993.

DU PONT, H. L.; CHAPPELL, C.L.; STERLING, C. R.; OKHUYSEN, P. C.; ROSE, J.B. ; JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 855-859, 1995.

ENRIQUEI, F. J. ; STERLING, C. R. *Cryptosporidium* Infectious in Inbred strains of mice. **Journal of Protozoology**, v.38, p.100-102, 1991.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 37-56, 2005.

FAYER, R.; GUIDRY, A.; BLAGBURN, B.L. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. **Infection and Immunity**,v. 58, p.2962-2965,1990.

FAYER, R., SPEER, C. ; DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*. In: R. Fayer (ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p.1-41,1997.

FAYER,R.; SANTÍN, M.; XIAO, L.*Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v.91,p.624-629, 2005.

FAYER, R.; MORGAN, U. ; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal of Parasitology** v. 30, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v.91,p. 624-629,2005.

FELTUS, D.C.; GIDDINGS, C.W.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; McEVOY, J.M. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p. 4303-4308, 2006 .

FENG,H; NIE, W; SHEORAN, A; ZHANG, Q; TZIPORI S. Bile acids enhance invasiveness of *Cryptosporidium* spp. into cultured cells. **Infection and Immunity**, v.74,p.3342-6, 2006a.

FENG H; NIE W; BONILLA R; WIDMER G; SHEORAN A; TZIPORI S. Quantitative tracking of *Cryptosporidium* Infection in cell culture with CFSE. **Journal of Parasitology**, v.92, p. 1350-1354, 2006b.

FLANIGAN,T.P.; AJI, T.; MARSHALL, R.; SOAVE, R.; AIKAWA, M.; KAETZEL, C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. **Infection and Immunity** , v. 59, p.234-239, 1991.

FLANIGAN, T.P.; SOAVE, R. Cryptosporidiosis. **Progress in Clinical Parasitology**, v.3,p.1-20,1993.

FRANCO, R. M. B. ; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidial* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia's River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 109-111, 2001.

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.

GIBSON, C.J.; STADTERMAN, K.L.; STATE, S.; SYKORS, J. Combined sewer overflows: a

source of *Cryptosporidium* and *Giardia*?. **Water Science and Technology**, v. 38, p. 67-72, 1998.

GILLES, H. M.; HOFFMAN, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, p. 95-97, 2002.

GILIOLO, 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.

GILIOLO, 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.

GOLD, D.; STEIN, B.; TZIPORI, S. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue cultura. **Journal of Parasitology**, v.87, p. 997-1000, 2001.

GONÇALVES, E.M.; DA SILVA, A.J.; EDUARDO, M.B.; UEMURA, I.H.; MOURA, I.N.; CASTILHO V.L.; CORBETT, C.E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinica**, v. 61, p.119-26, 2006.

GOSTIN, L.O.; LAZZARINI, Z., NESLUND, V.S., ;OSTERHOLM, M.T. Waterquality laves and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. **American Journal of Public Health** , v. 6 p.847-853, 2000.

GRAAF, D. C.; VANOPDENBOSCH, E.; ORTEGA-MORA, L. M.; ABBASSI, H. ;PEETERS, J. E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1269-1287, 1999.

GRIFFITHS, J.K. Human Cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and

diagnoses. **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 parvum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2503-2508, 1998.

GUIZELINI, E.; AMATO NETO, V. Isolation of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in loose stools of patients with AIDS and of immunocompetent children and adults in São Paulo, Brazil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.**, v. 47, p. 150-152, 1992.

GUT, J., PETERSEN, C, NELSON, R.; LEECH, J. *Cryptosporidium parvum* : in vitro cultivation in Madin-Darby caprine kidney cells. **Journal of Protozoology**, v. 38, p. 572- 573, 1991.

HANCOCK, C.M.; ROSE, J.B. ; CALLAHAN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in US groundwater. **Journal American Water Works Association**, v. 90, p. 5861, 1998.

HEINE, J F., MOON, H. W.; WOODMANSEE, D.B. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (pude) 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 Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.594-596, 1981.

HIJJAWI, NS., MELONI BP., NG'ANZO, M. RYAN, UM., OLSON, ME, COX, PT, MONIS, PT ; THOMPSON, RC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal Parasitology**, v. 34, p. 769-777, 2004.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. **International Journal Parasitology** v.31,p.1048-1055, 2001.

HIKOSAKA, K.; NAKAI, Y. A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. **Parasitology Research**, v.97,p.373-379, 2005.

HLAVSA, M.C., WATSON, J.C. ; BEACH, M.J. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 1999-2002 CDC's National Electronic Telecommunications system for surveillance, 2002.

JENKINS, M., TROUT, J.M., HIGGINS, J., DORSCH, M., VEAL, D ; FAYER, R. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitology Research**, v.89, p. 1-5, 2003.

JOE, A., HAMER, D. H., KELLEY, M. A., PEREIRA, M. E. A., KEUSCH, G. T., TZIPORI, S.; WARD, H. D. Role of a Gal/GalNAc-specific sporozoite surface lectin in *Cryptosporidium parvum*-host cell interaction. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.41, p.41-44, 1994.

KATSUMATA, T.; HOSEA, D.; RANUH, I.G.; UGA, S.; YANAGI, T.; KOHNO, S. Short report a possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 62, p. 70-73, 2000.

KEHL, K.S.; CICIRELLO, H.; HAVENS, P.L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 416-418, 1995.

KEUSCH, G.T.; HAMER, D.; JOE, A.; KELLEY, M.; GRIFFITHS, J.; WARD, H. Cryptosporidia--who is at risk? **Schweiz Medizinische Wochenschr.**, v. 125, p.899-908, 1995.

KISTEMANN, T., CLABEN, T., KOCH, C., DANGERDORF, F., FISCHEDER, R., GEBEL, J., VACATA, V. ; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2188-2197, 2002.

KUHLS, T.I., MOSIER, D.A. ; CRAWFORD, D.L. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. **Journal of Protozoology**, v. 38, p.S74-S76, 1991.

LACHARME, I.; VILLAR, V.; ROJO-VAZQUEZ, F. A.; SUÁREZ, S. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). **Microbes and Infection**, v. 6, p. 566-571, 2004.

LALLO, M.A. ; BONDAN, E.F. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública** v. 40, p.120-125, 2006.

LEARMONTH, J.J.; IONAS, G.; EBBETT, K.A.; KWAN, E.S. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.3973-3978, 2004

LERMAN DE ABRAMOVICH, B.; LURA, M.C.; GILLI, M.I.; HAYE, M.A. *Cryptosporidium* and water. **Vet. Argent. Microbiol.**, v. 31 , p. 97-105, 1999.

LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, E. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B. M., LEEDALE, G. F., LOEBLICH III, A. R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G. SPRAGUE, V., VAVRA, J ; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p. 37-58, 1980

LEVINE, N.D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. vol. 1 e li. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida 1998.

LINDSAY, D.S.; WOODS, K.M.; UPTON, S.J.; BLAGBURN, B.L. Activity of decoquinate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice. **Veterinary Parasitology**, v.89, p.307-311, 2000.

LINDSAY, D.S. Laboratory models of cryptosporidiosis. In: FAYER, R.(Ed), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.209 -223, 1997.

LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R. ; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n.sp.(Apicomplexa: cryptosporiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

LISLE, J. T. ; ROSE, J.B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini review. **Journal of Water Supply: Research and Technology Aqua**, v. 44, p. 103-177, 1995.

LOUREIRO, E.C., LINHARES, A.C. ; MATA, L. Cryptosporidiosis in children from 1 to 2 years

of age, with acute diarrhea in Belém, Para, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 117-122, 1989.

MA, P.; SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. **Journal of Infectious Disease**, v. 147, p.824-828, 1983

MAC KENZIE, W.; HOXIE, N.; PROCTOR, M.; GRADOS, M.; BLAIR, K.; PETERSON, D.; KAZMIERCZAK, J.; ADDISS, D.; FOX, K.; ROSE, J. ; DAVIS, J. 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 a.

MAC KENZIE, W.; SCHELL, W.; BLAIR, K.; ADDISS, D.; PETERSON, D.; HOXIE, N.; KARMIECKZAK, J. ; DAVIS, J. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 57-62, 1994 b.

MAILLOT, C.; FAVENNEC, L.; FRANCOIS, A.; DUCROTTE, P.; BRASSEUR, P. Sexual and asexual development of *Cryptosporidium parvum* in five oocyst sporozoite-infected human enterocytic cell lines. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v.44, p. 582-585, 1997.

MARQUES, FR., CARDOSO, L.V., CAVASINI, C.E., ALMEIDA, M.C., BASSI, N.A., ALMEIDA, M.T.G., ROSSIT, A.R.B., ; MACHADO, R.L.D. Performance of an immunoenzymatic assay for *Cryptosporidium* diagnoses of fecal samples. **Brazilian Journal of Infectious Disease** v. 9, p., 2005.

MARTINEZ, F.C., MASCARO, C., ROSALES, M.J., DIAZ, J., CIFUENTES, J. ; OSUNA, A. In vitro multiplication of *Cryptosporidium parvum* in mouse peritoneal macrophages. **Veterinary Parasitology**, v. 42, p.27-31, 1992

MARTINEZ, I. ; BELDA NETO, F. M. Contribution to the laboratory diagnoses of human cryptosporidiosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 43(2) p. 79-82, 2001

MARTÍN-GÓMEZ S; ALVAREZ-SANCHEZ MA; ROJO-VÁZQUEZ FA, Obtaining hyperimmune ante-Cryptosporidium parvum ovine colostrum. A study of the humoral immune response in immunized sheep. **Parasitology Research**, v.98,p.119-129, 2006.

MATSUBAYASHI, M. KIMATA, I., ISEKI, M. HAJIRI, T, TALAI, H. SASAI, K,; BABA, E. Infectivity of a novel type of Cryptosporidium andersoni to laboratory mice. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 165-169, 2005.

Mc DONALD, V., STABLES, R., WARHURST, D.C., BARER, M.R., BLEWETT, D.A., CHAPMAN, H.D., CONNOLLY, G.M., CHIODINI, P.L. ; Mc ADAM, K.P.W.J. In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 1498-1500 , 1990

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.

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.

MEHTA, P. Laboratory diagnoses of Cryptosporidiosis. **Journal of Postgrad. Medicine**, v. 48,p. 217, 2002

MEINHARDT, P.L.; CASEMORE, D.P.; MILLER, K.B. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. **Epidemiology Review**, v.18,p.118-136, 1996

MEISEL, J. L.; PEREIRA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology** v. 70, p. 1156-1160, 1976.

MORGAN, U.M.; CONSTANTINE, C.C.; FORBES, D.A.; THOMPSON, R.C. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR

analysis. **Journal of Parasitology**, v.83,p.825-830,1997.

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 and Hygiene**, v.52, p. 55954-564, 1995.

MORGAN-RYAN UM, FALL A, WARD L. A. HIIJAWI, N., SULAIMAN, I, FAYER, R., THOMPSON, R. C., OLSON, M, LAL, A, XIAO L., *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens* **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 49 p. 433-440, 2002

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious disease. **Emergent Infectious Disease**,v. 1,p.5-10, 1995

MOSIER, D.A. ; OBERST, R.D. Cryptosporidiosis : a global challenge. **Annals of New York Academic of Science.**, v. 96, p. 102-111, 2000

NACIRI, M., YVORE, P., DE BOISSEN, C.; ESNAULT, E. Multiplication de *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907) \* in vitro entretien d'une souche sur oeufs embryonnaires. **Rec. Med Vet.**, v.162, p. V56,1986 1986

NG, J.; PAVLASEK, L; RYAN,U..Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts . **Applied Environmental Microbiology**, y,.. 72,p.7548-7553, 2006

NICHOLS, R.A., CAMPBELL, B.M.; SMITH, H.V.Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. **Applied Environmental Microbiology**. v. 72, p. 5428-5435, 2006.

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.

NOVAK, S.M.; STERLING, C.R.Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Protozoology**, v. 38,p.103S-104S.,1991.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C.R. ; DUPONT, H.L. Virulence of three distinct *C. parvum* isolates for healthy adults. **Journal of Infectious Disease.**, v. 180, p.1275-1281, 1999.

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

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.72, p.128-131,1996.

PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR, C ; Mc LAUHLIN. The Identification and characterization of na unusual genotype of *Cryptosporidium* froco human faeces as *C. meleagridis*. **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Letters**,v. 189, p. 189-194, 2000.

PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR, C.; IVERSEN, A. M.; STANLEY, P. J.; Mc LAUHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered froco human faeces: First description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium Vog type"*, froco patients in England. **Journal Medica) and Microbiology**, v.50, p.293-296, 2001 a.

PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR, C.; Mc LAUHLIN, J.; NICHOLS, G.; COTTON, K.; GODWIN, P.; IVERSEN, A.; MILNE, L.; MULLA, J.; NYE, K.; PANIGRAHL, H. VENN, S.; WIGGINS, R.; WILLIAMS, M.; YOUNG, E. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. **Journal of Infection**. V. 42, p. 1-8, 2001 b

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. V. XVI, p. 202-240,1995.

PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A.

C. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emergent Infectious Disease**, v. 3, p. 567-573, 1997.

PEREZ-SCHAEL I., BOHER, Y., MATA, I., PEREZ, M.; TAPIR, F.J. Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 34, p. 721-722, 1985.

PETRY, F.; ROBINSON, H.A.; MCDONALD, V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1922-1924, 1995.

PETRY, F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopic Microanalysis**, v. 10, p. 586-601, 2004.

PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F. J.; SLEMENDA, S. B.; SILVA, A. J.; MOURA, I. N. S.; ARROWOOD, M. J.; DITRICH, O.; ADDISS, D.G. New *Cryptosporidium genotypes* in HIV-infected persons. **Emergent Infectious Disease** . v. 5, p. 444-449, 1999.

PITLIK, S.D.; FAINSTEIN, V.; GARZA, D.; GUARDA, L.; BOLIVAR, R.; RIOS, A.; HOPFER, R.L.; MANSELL, P.A. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. **Archiv International of Medicine**, v. 143, p. 2269-2275, 1983.

RAMUSSEN, K.R., LARSEN, N.C. ; HEALEY, M.C. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 1482-1485, 1993.

RASMUSSEN, K.R., HEALEY, M.C. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1648-1652, 1992.

REHG, J. E., HANCOCK, M. L.; WOODMANSEE, D. B. Characterization of a dexamethasone-treated rat model of cryptosporidial infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 158, p. 1406-1407, 1988.

RIEPIERANT, J. M.; NACIRI, M.; IOCHMAN, S.; TILLEY, M.; BOUT, D. T. Major antigens of *Cryptosporidium parvum* recognised by serum antibodies from different infected animal species and man. **Veterinary Parasitology**,v.55,p. 1-13, 1994.

RIGGS, M.W. Immunology: host response and development of passive immunotherapy and vaccines. **IN:** Fayer(Ed.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC., Press Inc., New York, p.129-162, 1997.

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.

ROCHELLE, P.A.; MARSHALL, M.M.; MEAD, J.R.; JOHNSON, A.M.; KORICH, D.G.; ROSEN, J.S.; DE LEON, R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.68,p.3809-3817, 2002.

ROSALES, M.J., CIFUENTES, J. ; MASCARO. C. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**. v.. 76, p. 209-212, 1993

ROSE, J. B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annual Review of Public Health**, v. 18, p. 135-161, 1997.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Reviews**, v. 26, p113-123, 2002.

RYAN,U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H.L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE ,B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R.C.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidüdae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**,v.90,p.769-773,2004.

SARGENT, K.D., MORGAN, UM., ELLIOT, A.; REW-THOMPSON, RC. Morphological and

genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. **American Journal Tropical and Medicine and Hygiene**. V. 52, p. 559-564, 1998

SHERWOOD, D.; ANGUS, KW; SNODGRASS, D.R. ; TZIPORI, S. Experimental Cryptosporidiosis in laboratory mice. **Infection and Immunity**, v. 38, p.471-475.,1982.

SHIANNA, KV; RYTTER,R.; SPANIER, J.G. Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from the watershed of the Red River of the North. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2262-2265,1998.

SINGH, I.; THEODOS, C.; LI, W.; TZIPORI, S. Kinetics of *Cryptosporidium parvum*-specific cytokine responses in healing and nonhealing murine models of *C. parvum* infection. **Parasitology Research**, v. 97, p. 309–317, 2005.

SLAPETA, J. Cryptosporidium species found in cattle: a proposal for a new species **Trends in Parasitology**, v.22,p. 469-474, 2006.

SLAPETA,J. Response to Xiao et al: further debate on the description of *Cryptosporidium pestis*. **Trends in Parasitology**, v. 23,p.42-43,2007.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.) **J. Com. Pathol.** v. 65, p. 262-266, 1955

SLIFKO, T.R.; HUFFMAN, D.E. ; ROSE, J. A. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3936-3941, 1999.

SMITH, H. V. ; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B.; GRIMASON, A. M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 134-142, 2005.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G.; XIAO, L.; MILLAR, B. C.; ROONEY, P. J.; SNELLING, W. J. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 7-16, 2006.

SRIVASTANA, O.P., STEELE, M.I. ; TORRES-PINEDO, R. Maturation changes in terminal glycosylation of small intestinal microvillar proteins in the rat. **Biochemistry Biophysics Acta.**,v.914,p.143-151,1987.

STANTIC-PAVLINIC, M.;XIAO, L.; GLABERMAN, S.; LAL. A.A.; OREZEN,T.; RATAJ-VERGLEZ, A.; LOGAR, J.; BERCE, I. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 28, p.125-127, 2003.

STROUP, S.E.; ROY, S.; MCHELE, J.; MARO, V.; NTABAGUZI, S.; SIDDIQUE, A.; KANG, G.; GUERRANT, R.L.; KIRKPATRICK, B.D.; FAYER, R.; HERBEIN, J.; WARD, H.; HAQUE, R.;HOUP, E.R. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probas **Journal Medicine of Microbiology**. v. 55,p.1217-1222,'2006.

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

THEA, D.M., PEREIRA, M.E.A., KOTLER, D., STERLING, C.R., KEUSCH, GT., TZIPORI, S. ; WARD, HD. Identification and partial purification of a lectin on the surface of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Parasitology**, v.78, p. 886-893,1992

TRAVIS, W.D.; SCHMIDT, K.; MACLOWRY, J.D.; MASUR, H.; CONDRON, K.S.; FOJO, A.T. Respiratory Cryptosporidiosis in a patient with malignant lymphoma. Report of a case and review of the literature. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** , v.114,p.519-522,1990.

TYZZER E.E.. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v. 23, p. 487-509, 1910.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings Society Experimental Biology Medicine**, v.5, p.1213, 1907.

TYZZER,E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archiv fur Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis. Laboratory investigations and chemotherapy. **Advances in Parasitology**, v. 40, 5-36,1998.

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.; SMITH, M.; BIRCH, C.; BARNES, G.; BISHOP ,R.Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.32,p.931-934,1983.

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in perspective.**Advances in Parasitology** v. 27,p. 63-129,1988.

TZIPORI, S ; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection** v. 4, p. 1047-1058, 2002.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. The biology of *Cryptosporidium*. **Contrib. Microbiology**, v. 6, p. 1-32, 2000.

UNGAR, B.L.P., KAO, T.C., BURRIS, J.A. ; FINKELMAN, F.D. *Cryptosporidium* in an adult mouse model. Independent roles for IFN - gamma and CD 4<sup>+</sup> T lymphocytes in protective immunity. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 1014-1022,1991

UNGAR, B.L. P., J.A. BURRIS, C.A. QUINN,; F. D. FINKELMAN. New mouse models of chronic *Cryptosporidium* Infection in immunodeficient hosts. **Infection and Immunity**, , v.58, p.961-969, 1990.

UPTON, S.J. In vitro cultivation. In : *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis* (ed. Fayer,R.) CRC,'Boca Raton, Florida, p.181-207,1997.

UPTON, S.J., TILLEY, M.,; BRILLHART,D.B 1994 b. Comparativa development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell. **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Letters** v.. 118, p. 223 - 236, 1994a.

UPTON, S.J., TILLEY, M. , NESTERENKO, M.V., ; BRILLHART,D.B. A simple and reliable method of producing in vitro Infection of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Letters**,v. 118 p. 45-50, 1994 b

URBAN,J.F.Jr.; FAYER, R.; SULLIVAN, C.; GOLDHILL,J.; SHEA-DONOHUE, T.; MADDEN, K.; MORRIS, S.C.; KATONA, I.; GAUSE, W.; RUFF, M.; MANSFIELD, L.S.; FINKELMAN, F.D. Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestino: regulation by IFN-gamma and IL-4. **Veterinary Immunology and Immunopathology**,v. 54,p.337-344,1996.

VILLACORTA, I.; de GRAAF,D.; CHARLIER, G.; PEETERS, J.E. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in MDBK cells. **Federation of European Microbiological Societes - Microbiology Letters**, v. 142, p.129132,1996.

VITOVEC, J.; KOUDELA,B. Location and pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mico. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, series B**,v.35,p.515-524, 1988.

WATERS, W.R.,; PALMER.M.V.;WANNEMUEHLER,M.J.; SACCO,R.E.; HARP,J.A. B cells are required for the induction of intestinal infammatory lesions in Tcr a - deficient mire persistently infected with *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Parasitology**, v. 86,p.1073-1077,2000.

WENDT,D., SACOWSKI, L., MARKOWITZ, N.; SARAVOLATZ, L. Prevalence of serum antibody to human immunodeficiency virus among hospitalized intravenous drug abusers in a low-risk geographic ares. **The Journal of Infectious Diseases.**, v. 155,p.151-152,1987.

WHO. Acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Revision of the case definition of AIDS. Weekly

Epidemiological Record, v.60,p.270-271,1985b

WHO. Acquired immune deficiency syndrome (AIDS). WHO consultation. Weekly Epidemiological Record, v.60,p.129-130,1985a

WIDMER, G.; COREM, E. A.; STEIN, B.; GRIFFITHS, J. K.; TZIPORI, S. Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development in vitro. **Journal of Parasitology**, v. 86, p.922-928, 2000.

WIDMER, G., LIN, L., KAPUR, V., FENG, X.; ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infectious** v.4, p. 1081-1090, 2002.

WIDMER, G.; YANG, .L.; BONILLA, R.; TANRIVERDI ,S.; CIOCIOLA K,M.Preferential infection of dividing cells by *Cryptosporidium parvum*.**Parasitology**, v.133,p.131-138, 2006

WIEST, P.M. JOHNSON,J.H., FLANIGAN, T.P. Microtubule inhibitors block *Cryptosporidium parvum* infection of a human enterocyte cell line. **Infection and Immunity**, v.61,p. 4888-4890,1993

.WOLFSON, J.S., RICHTER,J.M., WALDRON,M.A., WEBER,D.J., McCARTHY,D.M., HOPKINS,C.C. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. **The New England Journal of Medicine** v. 12,p.1278-1282, 1985.

WONG, P.H.; ONG, C.S. Molecular characterization of the *Cryptosporidium cervine* genotype.**Parasitology**, v. 1 33,p.693-700, 2006.

WOODMANSEE,D.B., ; POLENZ, JFL. Development of *Cryptosporidium* sp, in a human rectal tumor cell line. **In: Proceedings . of the Fourth Intemational Symposium on neonatal diarrhea . Veterinary Infectious Disease Organization, p. 306- 319. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada 1983**

WOODS, K.M.; NESTERENKO, M.V.; UPTON, S.J..Efficacy of 101 antimicrobiais and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Annual of Tropical Medicine and Parasitology**, v.90,p.603615,1996.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U.; UPTON, S. *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 72-97, 2004

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U. ; UPTON, S.J.. Response to the newly proposed species *Cryptosporidium pestis*. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 4142, 2007.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Disease**, v. 183, p.492-497, 2001.

XIAO, L. ; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion Infectious Disease**, v. 17, p. 483-490, 2004.

XU, P.; WIDMER, G.; WANG, Y.; OZAKI, L. S.; ALVES, J. M.; SERRANO, M. G.; PUIU, D.; MANQUE, P.; AKIYOSHI, D.; MACKAY, A. J., PEARSON, W. R.; DEAR, P. H.; BANKIER, A. T.; PETERSON, D. L.; ABRAHAMSEN, M. S.; KAPUR, V.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A. The genome of *Cryptosporidium hominis*. **Nature**, v. 431, p. 107-1112, 2004.

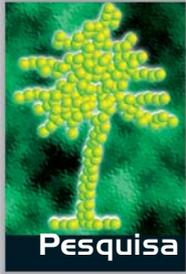
YANG, S.; BENSON, S.K.; DU, C.; HEALEY, M.C. Infection of immunosuppressed C57BU6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Parasitology**, v. 86, p.884-887, 2000.

YANG, S. HEALEY, M.C., DU, C.; ZHANG, Z.J. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 349-354, 1996

YU, J.R.; CHOI, S.D.; KIM, Y.W. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. **Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 59-64, 2000.

Os espertos aprendem com os erros dos outros,  
Os normais com os seus próprios erros  
E os não-espertos jamais aprendem.

**Mary Britto**



# Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes

Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes

## Delma Pegolo Alves

Doutoranda do Depto de Parasitologia  
IB - Unicamp  
Diretora Associada do CEMIB  
Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica  
delma@cemib.unicamp.br

## Maria Helena Seabra Soares de Britto

Mestre em Imunologia - Unicamp  
Doutoranda do Depto de Parasitologia  
IB - Unicamp  
Professora do Depto de Farmácia da  
Universidade Federal do Maranhão  
mbssb@elo.com.br

## Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profª Drª do Instituto de Biologia  
Departamento de Parasitologia - Unicamp  
Diretora do CEMIB - Centro Multidisciplinar para  
Investigação Biológica  
guaraldo@cemib.unicamp.br

Fotos cedidas pelos autores

## 1. Introdução

Em 1907, TYZZER descreveu *Cryptosporidium muris* para designar um pequeno protozoário coccídeo, encontrado nas glândulas gástricas de camundongo. Posteriormente, em 1912, TYZZER descreveu uma nova espécie *Cryptosporidium parvum*. Por meio de infecção experimental em camundongos, ele demonstrou que *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 (GRIF-FITHS, 1998).

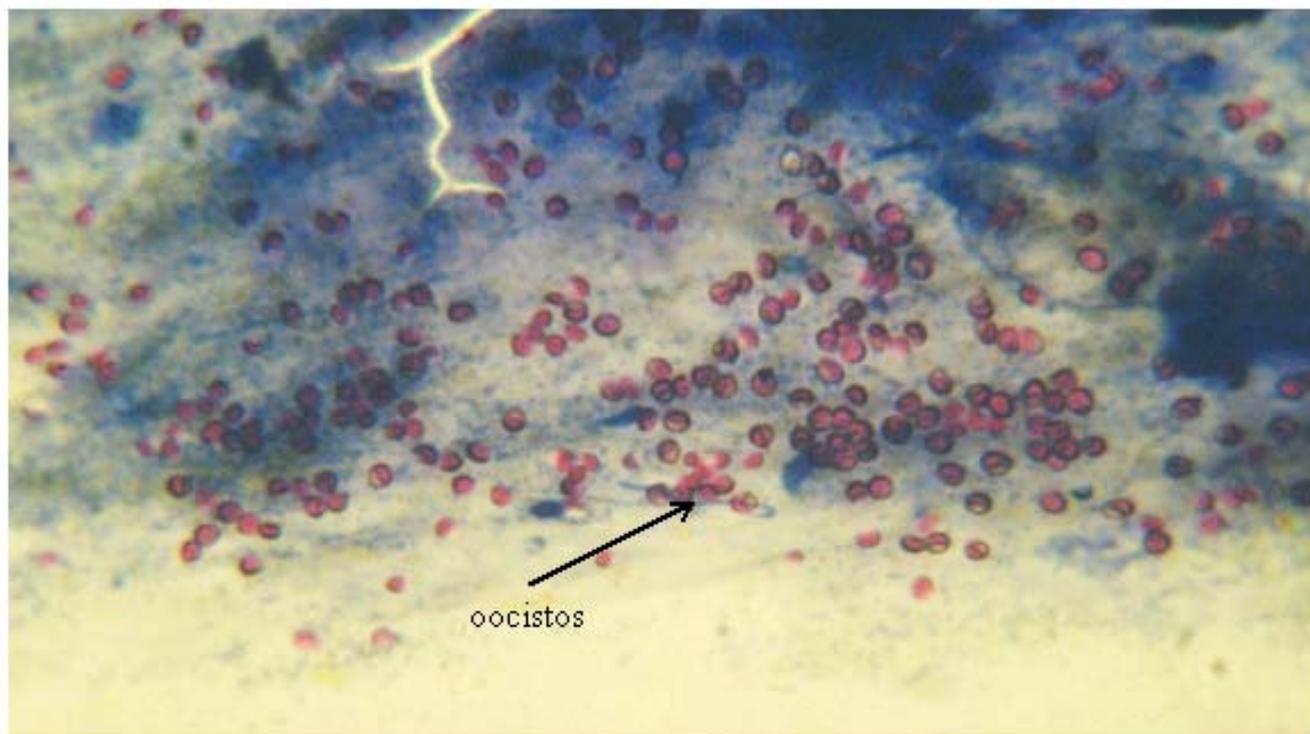
Morgan-Ryan et al, 2002, descreveram uma nova espécie de *Cryptosporidium*, designando a de genótipo humano de *C. parvum*, genótipo 1 ou genótipo H. Considerando as diferenças biológicas e moleculares, esta nova espécie foi denominada: *Cryptosporidium hominis*.

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 Bra-



**Figura 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

sil, 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 suscetíveis 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<sup>l</sup>), 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- $\gamma$  (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- $\gamma$ , 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

**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- $\gamma$	40
C57BL/6/Uni bg	20
C3H/Uni nu	40
C57BL/6/Uni	0

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- $\gamma$ . 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 1500g, 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  $\mu$ L) em solução de verde de malaquita (80 mL), 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 4 a 6 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- $\gamma$ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*; linhagem imunocompetente controle C57BL/6/Uni.

A colônia 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.

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.

## 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 primei-

ras 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 acoplado à câmara clara, com aumento de 1000X. Os resultados foram expressos como 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 Metodologia 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 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 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- $\gamma$ . Esta linhagem de *Cryptosporidium* sp encontra-se na 67ª 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- $\gamma$ , em ambiente controlado (Fig.1).

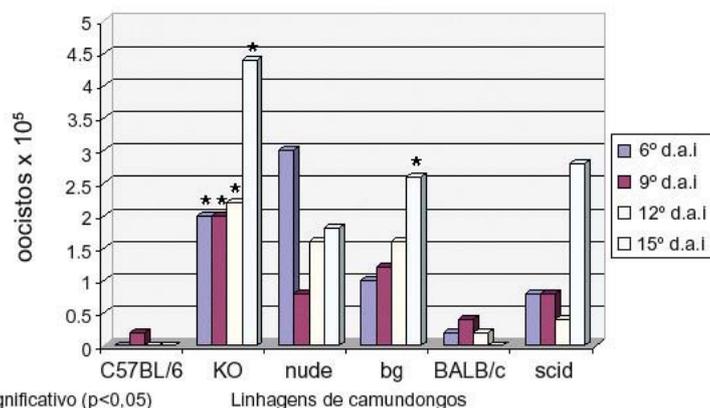
Considerando a taxa de mortalidade nos animais imunodeficientes e imunocompetentes (Tabela I), não houve morte na linhagem scid, assim como no controle. Os camundongos nude, KO e bg apresentaram mortalidade no 11º dia após infecção.

O comportamento das linhagens imunodeficientes e imunocompetentes, quanto a liberação de oocistos nas fezes, foi avaliado a partir do 6º dia até o 15º dia após a infecção (Figura 2).

#### 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



\* Significativo ( $p < 0,05$ )

**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.

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 morfológica 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), pe-

los 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- $\gamma$  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<sup>(m)</sup> e C57BL/6J-Ifg<sup>(m)</sup>). Os camundongos BALB/c-Ifg<sup>(m)</sup> desenvolveram infecção moderada com média de eliminação de oocistos 100 vezes menor em relação ao camundongo C57BL/6J-Ifg<sup>(m)</sup>.

O estudo da ação de citocinas durante a infecção pelo *Cryptosporidium parvum* em camundongos knockout (KO) para IL-4, IL-10, IL-12 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 às 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- $\gamma$ .

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<sup>-</sup> apresentam perfil de infecção semelhante aos camundongos nude.

Ungar et al, 1991, avaliaram o papel de INF- $\gamma$ , 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- $\gamma$  e contribuição do linfócito CD4. Na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Cryptosporidium* sp, também é acionado um mecanismo independente de linfócitos T, no qual os macrófagos ativados induzem a secreção de IFN- $\gamma$ , pelas células NK (BANCROFT & KELLY, 1994).

A análise estatística da eliminação de oocistos no decorrer da infecção evidenciou que a linhagem KO para IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  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 delimiting 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. Occurrence 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., RODRI-

- GUES, 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., PARRIS, M., & TZIPORI, S. The gamma interferon gene Knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. **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 Veterinaria 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) 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.
- 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.

**APÊNDICE II:**

## **Capítulo 28**

### **Cultivo celular de *Cryptosporidium* spp.**

*Regina Maura Bueno Franco*  
*Ana Maria Aparecida Guaraldo*  
*Maria Helena Seabra Soares de Britto*

#### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Os sistemas de cultivo do protozoário *Cryptosporidium* (Filo Apicomplexa; Família *Cryptosporidiidae*), atualmente disponíveis, permitem a infecção *in vitro* de células hospedeiras com oocistos ou esporozoítos, previamente purificados, que se replicam nas monocamadas celulares por períodos variados (até 25 dias), sob condições de cultura bem definidas [19]. O cultivo de curta duração deste protozoário tem sido amplamente usado para os estudos de eficácia de drogas [32,48] ou com a finalidade de investigar a interação entre o protozoário e a célula hospedeira, na ausência de bactérias intestinais (23).

Outra aplicação importante do cultivo de *Cryptosporidium in vitro* é a avaliação do potencial infectante do protozoário frente aos diversos tratamentos químicos, desinfetantes ou estresse ambiental, com a finalidade de determinar os riscos em saúde pública [35].

Enquanto os ensaios de infectividade de diferentes cepas do parasito *in vivo*, utilizando modelos animais, principalmente camundongos, apresentam várias restrições, tais como o tempo necessário para obtenção dos resultados (entre 7 a 10 dias após infecção) e a variabilidade de resultados em função da susceptibilidade individual das linhagens de camundongos frente à infecção [35], o teste de infectividade *in vitro*, baseado no cultivo do protozoário em linhagens de células hospedeiras, tornou-se uma alternativa bastante viável, considerando a capacidade de algumas linhagens celulares (HCT-8: células tumorais humanas e MDCK- células Madin-Darby de rim

*canino*) em suportar o crescimento de *Cryptosporidium hominis* [21]. Esta espécie, inclusive, parece não ser infectante para o modelo animal murino, incluindo os camundongos “gama-knockout” (46). Passados 23 anos após o primeiro relato do cultivo *in vitro* de *Cryptosporidium*, com obtenção dos estádios assexuados do parasito por Woodmansee & Pohlenz (47), em 1983, uma grande variedade de protocolos em diferentes condições de crescimento foi desenvolvida e, até o momento, mais de 20 linhagens de células hospedeiras foram estudadas em sua capacidade de suportar o crescimento do protozoário (Tabela 28.1).

**Tabela 28.1:** Evolução da cultura “*in vitro*” do protozoário *Cryptosporidium* em linhagens celulares de várias espécies de vertebrados, no período de 1983 a 2005.

Linhagem celular (abreviatura)	Nome da célula	Meio de Cultivo	Produção <i>in vitro</i> de Oocistos	Referência bibliográfica <sup>1</sup>
HRT	Células do tumor retal humano.	RPMI 1640	Não	Woodmansee & Pohlenz, 1983 <sup>(47)</sup> .
CAM	Células da endoderme da membrana córioalantóica de embrião de galinhas.	-	Sim	Current & Long, 1983 (7)*; Naciri et al., 1986 <sup>(31)</sup> Lindsay et al., 1988 (26).
HFL; PCK e PK10	Células pulmonares fetais humanas; células primárias do rim de galinha e rim de suínos.	MEM	Sim	Current & Haynes, 1984. (8)
BHK	Células renais de hamster	-	NR	Naciri et al., 1986 (31).
MDCK	Células Madin-Darby de rim canino.	DMEM	NR	Lumb et al., 1988 (27);
		MEM	Sim	Gut et al., 1991(17); Rosales et al., 1993 (36).
Caco-2	Célula de adenocarcinoma do cólon. Cultura Primária de Hepatócitos de ratos.	DMEM	Sim	Datry et al., 1989 (11); Griffiths et al., 1994 (16).
		MEM	Sim	Datry et al., 1989 (11).
L929	Fibroblastos murinos.	RPMI 1640	NR	McDonald et al., 1990 (29).

LGA	Células de carcinoma do Intestino Delgado de Ratos.	F <sub>10</sub> de HAM	NR	Bonnin et al., 1990 <b>(4)</b> .
HT29.74	Células do adenocarcinoma de cólon humano.	Leibovitz L-15 e RPMI 1640	NR	Flanigan et al., 1991 <b>(15)</b> .
MDBK	Células de Madin-Darby de rim bovino.	RPMI MEM	Sim Sim	Gut et al., 1991 <b>(17)</b> Villacorta et al., 1996 <b>(45)</b> .
407	Células intestinais de embrião humano	RPMI 1640	NR	Kuhls et al., 1991 <b>(22)</b> .
RL-95-2	Células de carcinoma endometrial humano	DMEM + Meio de Ham's F12	I	Rasmussen et al., 1993 <b>(34)</b> .
T84	Células epiteliais do colón humano.	DMEM + Meio de Ham's F12	NR	Adams et al., 1994 <b>(1)</b> .
HCT-8	Células do adenocarcinoma ileocecal humano.	RPMI 1640 DMEM RPMI 1640	Sim Sim	Upton et al., 1994 <b>(41)</b> ; Maillot et al, 1997 <b>(28)</b> <sup>1</sup> ; Hijjawi et al., 2001 <b>(19)</b> <sup>**</sup> .
BFTE	Células da trompa de falópio bovina.	RPMI 1640	Sim	Yang et al., 1996 <b>(49)</b> <sup>*</sup> .
LIM1215; HF	Célula de tumor do colón; fibroblastos humanos.	RPMI 1640	Não	Meloni & Thompson, 1996. <b>(30)</b>
THP-1	Célula mielomonocítica.	RPMI 1640	Sim	Lawton et al., 1996 <b>(24)</b> ; Lawton et al., 2003 <b>(25)</b> .
BS-C-1	Células de rim de macacos.	MEM	Sim	Deng & Cliver, 1998 <b>(12)</b> <sup>1</sup> .
VeLi	Condrócitos da cartilagem auricular de coelhos.	DMEM	Sim	Lacharme et al. 2004 <b>(23)</b> <sup>*</sup> .
AGS	Células de adenocarcinoma humano.	RPMI 1640	Sim	Choi et al., 2004 <b>(6)</b> <sup>1</sup> .

NR = não relatado; I = indeterminado; <sup>1</sup> = referências selecionadas.

\* = oocistos produzidos *in vitro* foram infectantes para camundongos (teste de infectividade animal).

\*\* = primeiro relato do cultivo *in vitro* do protozoário durante 25 dias (longa duração).

Encerrando a primeira década de tentativas em cultivar o protozoário *in vitro*, a realização completa do ciclo biológico de uma cepa de *Cryptosporidium* (originária de paciente portador de SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), e com clara

evidência da presença de oocistos *in vitro*, foi finalmente obtida por Datry et al. (1989) **(11)**, em 2 linhagens celulares distintas: a primeira, células de adenocarcinoma humano (Caco-2) e a segunda, cultura primária de hepatócitos de ratos. Formas parasitárias correspondentes às fases assexuadas, sexuadas e oocistos foram observadas nas culturas de hepatócitos enquanto que nas células Caco-2, somente oocistos foram identificados.

Até 1990, o cultivo celular de *Cryptosporidium* foi obtido a partir de esporozoítos, oriundos de oocistos previamente purificados em gradientes de sacarose, ou flutuação em solução de Sheather, tratados com antibióticos com o objetivo de prevenir o crescimento de contaminantes microbianos. Apesar da comprovação da presença de oocistos nessa cultura, suas paredes apresentavam-se apenas parcialmente formadas **(17)**. Em sua maioria, os estudos publicados até esta data eram descritivos, enfatizando o grau de desenvolvimento do parasito em diversas linhagens celulares. No início dos anos 90, as novas técnicas de manipulação dos oocistos e de esporozoítos, as otimizações dos protocolos de cultivo celular de *C. parvum* e os estudos comparativos das diversas linhagens celulares passaram a ser objeto das investigações científicas.

Assim, coube a Hijjawi et al. (2001) **(19)**, o mérito de obter e descrever, pela primeira vez, o completo desenvolvimento dos genótipos humano (ou genótipo 1) e bovino (ou genótipo 2) de *C. parvum* e a sua manutenção durante 25 dias em sistemas de cultivo *in vitro*. Os autores observaram o desenvolvimento de ambos os genótipos em células HCT-8, desde esporozoítos até a produção de oocistos esporulados. A longa manutenção do crescimento parasitário foi obtida mediante a transferência dos estádios do protozoário, presentes no sobrenadante das culturas, para novas células HCT-8. Até 2001, os dados da literatura mostravam que o crescimento máximo do protozoário era alcançado ao redor de 48 a 72 horas após infecção celular sofrendo, a seguir, um declínio gradual **(14,24,40)**.

Hijjawi et al.(2001) **(19)** também observaram que o desenvolvimento *in vitro* dos genótipos “humano” e “bovino” foi similar, mas relataram que os parasitos pertencentes ao genótipo humano requeriam menos tempo para completar o ciclo de vida, nas

células HCT-8 (ao redor de 72 h.p.i.) quando comparados ao “genótipo bovino” (120 h.p.i.). Outros aspectos biológicos importantes foram registrados neste estudo, como a maior agressividade do genótipo humano durante seu crescimento nas células hospedeiras. Importante também são os diferentes resultados obtidos sobre a infectividade dos oocistos obtidos por cultivo celular: quando derivados do genótipo bovino, foram aptos em causar infecção experimental em camundongos enquanto aqueles oocistos pertencentes ao genótipo humano falharam.

Até o momento, nenhum sistema permanente de propagação *in vitro* de *Cryptosporidium* foi estabelecido (33). A incapacidade de propagar o protozoário em sistema de cultivo celular continuamente pode ser resultado de deficiências nutricionais do meio de cultura, da presença de condições “redox” inapropriadas ou morte da célula hospedeira ao longo da infecção (35). Outra limitação importante reside no fato de que ainda não é possível iniciar a re-infecção da linhagem celular com oocistos produzidos *in vitro* (24). Portanto, a infecção experimental animal “*in vivo*” ainda é necessária para a obtenção de grande número de oocistos.

Ainda em 2004, Hijawi et al. (20), descreveram o desenvolvimento completo do genótipo bovino de *Cryptosporidium parvum*, em meio difásico (que consistiu em soro de bezerro recém-nascido e meio RPMI 1640), sem a presença de células hospedeiras. Caso estes dados possam ser reproduzidos em outros laboratórios, estes resultados representam um avanço significativo para a pesquisa *in vitro* do protozoário.

## **REQUERIMENTOS NECESSÁRIOS PARA O CULTIVO CELULAR DE CRYPTOSPORIDIUM:**

O sistema de cultivo celular do protozoário *Cryptosporidium* pode ser sumarizado como segue (3,44):

**ISOLADOS DO PARASITO:** a partir de fezes humanas ou de animais é produzida uma suspensão purificada de oocistos mediante a centrifugação em gradiente de

densidade. Para os procedimentos de purificação, devem ser utilizados laboratórios com nível 2 de segurança biológica;

**ESCOLHA DA LINHAGEM DA CÉLULA HOSPEDEIRA:** escolhida a linhagem celular que servirá como hospedeira do parasito, as mesmas podem ser adquiridas junto aos bancos de células certificados internacionalmente e devem ser mantidas em meio próprio para cultura de células, previamente à inoculação, em tempo pré-determinado para a confluência das células em monocamadas;

**DEFINIÇÃO DA DOSE E TIPO DE INÓCULO:** a infecção *in vitro* pode ser promovida pelo contato direto entre a célula hospedeira e os oocistos ou esporozoítos. Antes da infecção, a enumeração destes organismos deve ser realizada a partir de suspensões purificadas; alíquotas com concentrações diferentes de parasitos devem ser testadas para o cálculo da dose infectante; no caso de infecção com esporozoítos, é necessária sua excitação prévia *in vitro*, após estímulo apropriado;

**INFECÇÃO IN VITRO:** após contato direto entre as células hospedeiras e os oocistos ou esporozoítos os quais invadem as células hospedeiras cultivadas em meio apropriado. Após a infecção, é adicionado meio de cultura novo e suplementado de modo a suportar o crescimento parasitário. A cultura é mantida a 37°C, em condições ideais de umidade e atmosfera de CO<sub>2</sub>;

**REPRODUÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO:** no interior das células hospedeiras, reproduz-se o ciclo de vida do protozoário, formando agrupamentos ou focos de infecção. Maior número de parasitos é obtido durante o período de 48 a 72 h.p.i.;

**VISUALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PARASITOS EM DESENVOLVIMENTO:** os focos de desenvolvimento parasitário, contendo diferentes estágios parasitários, podem ser visualizados e enumerados, após marcação com anticorpos específicos (monoclonais ou policlonais por Reação de Imunofluorescência Direta) ou mediante o uso de colorações específicas (Giemsa, Azul Alcian ou ambos).

A seguir, comentam-se alguns procedimentos descritos na literatura e relatam-se os protocolos utilizados para a infecção das células de rim bovino (“*Madin-Darby Bovine Kidney cells*”) com a cepa MMc/Uni de *Cryptosporidium*, de origem humana (2,5) no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia, Unicamp:

## CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS

Uma suspensão de oocistos, infectantes e livres de sujidades é essencial para estabelecer, com sucesso, o cultivo celular do protozoário. Diversos métodos de purificação de oocistos, a partir de fezes de animais ou humanas, foram propostos na literatura estão sumarizados nas revisões sobre o cultivo celular de *Cryptosporidium*, publicadas por Upton (1997) (44) e Arrowood, em 2002 (3), com base na separação dos oocistos mediante o emprego de solução saturada de sacarose ou de cloreto de sódio e, de gradientes de densidade utilizando Percoll®, cloreto de céσιο ou sacarose-Percoll®.

Tanto a qualidade dos reagentes empregados durante os protocolos de purificação como as condições de armazenamento dos oocistos, após purificação, podem influenciar a manutenção da infectividade do protozoário.

Inicialmente, as fezes devem ser colhidas preferencialmente em solução de dicromato de potássio entre 2,0% e 5,0%. A remoção de detritos grosseiros e de lipídios é efetuada mediante a filtração da suspensão fecal em peneiras plásticas ou metálicas (60 a 200 orifícios/1mm<sup>2</sup>), seguida de centrifugação do líquido resultante com um solvente como éter etílico ou acetato de etila. A correta relação entre o tipo de rotor da centrífuga (em rpm) e força gravitacional (*g*), deve ser respeitada, pois o uso de velocidades inferiores a 800 x *g* (5 min.) pode acarretar a perda de oocistos no sobrenadante. Finalmente, os procedimentos de flutuação em soluções de sacarose, cloreto de sódio ou de céσιο (com gravidades específicas de 1,20 g/mL e 1,80 g/ml, respectivamente), ou em gradientes de diferentes densidades (variando de 1,40g/mL a 1,05 g/mL) podem ser utilizados com o objetivo de concentrar os oocistos, embora nenhum destes protocolos tenha resultado em suspensões completamente purificadas.

Tão logo os oocistos sejam recuperados, após a etapa de purificação, devem ser imediatamente lavados em solução tampão fostato (PBS; pH 7.2 -7.6) ou água destilada (2000 x g; 20 min.) para prevenir a ocorrência de dano ao parasito e, a seguir, armazenados em solução tampão fosfato, salina ou de Hanks, após suplementação com antibióticos e anti-fúngicos **(45)**. A manutenção da infectividade depende da temperatura e meio de armazenamento; quando em condições adequadas (4°C-8°C), os oocistos podem reter a sua capacidade infectante *in vivo* por cerca de 12 meses **(9)**, mas, para os testes de infectividade, não devem ser utilizados após 6 meses de armazenamento **(30)**.

### **TÉCNICA DE PURIFICAÇÃO DOS OOCISTOS:**

A técnica para a purificação dos oocistos descrita a seguir foi fundamentada a partir da combinação de metodologias descritas por Current (1990) **(9)**; Current & Garcia (1991) **(10)** e Tzipori (1988) **(39)**:

1. Coletar as fezes em frascos contendo solução de dicromato de potássio 5,0%, na proporção de 3:1; manter sob refrigeração (4°C).
2. Peneirar a suspensão fecal em gaze (1x);
3. Deixar em repouso, durante 1 hora, à temperatura ambiente;
4. Recuperar o sobrenadante imediatamente superior ao precipitado;
5. Adicionar éter etílico (na proporção de (1:1) e agitar vigorosamente durante 30 segundos;
6. Aguardar alguns minutos; serão formadas 4 camadas distintas; retirar as camadas aquosas contendo os oocistos;
7. Transferir para tubos cônicos de centrifugação, limpos e proceder à lavagem das camadas aquosas em solução tampão fosfato 0,01 M (pH 7,2-7,4), contendo Tween 20 a 0,2%, centrifugando a 1500 x g, durante 10 minutos (4°C); efetuar várias lavagens nas mesmas condições, até que os resíduos da solução de dicromato de potássio sejam completamente removidos;

8. Ressuspender os sedimentos resultantes em 2,5 mL da solução tampão-fosfato contendo Tween 20 (0,2%);

9. Adicionar 10 mL de solução saturada de sacarose (gr.sp.=1,2g/mL) e após nova agitação vigorosa, centrifugar a 1000 x g (10 min.), a 4°C;

10. A seguir, adicionar gentilmente, deixando escorrer pelas paredes dos tubos, cerca de 2,5 mL de solução aquosa de Tween 20 (0,2%). Aguardar alguns minutos e retirar, cuidadosamente, as camadas superiores, onde se concentram os oocistos.

11. Aos sedimentos que permaneceram no fundo dos tubos, adicionar novamente 10 mL de solução saturada de sacarose, repetindo as duas últimas etapas precedentes, tendo o cuidado de colher as camadas aquosas superiores, transferindo-as para tubos limpos;

12. Finalmente, lavar as camadas superiores contendo os oocistos, em centrifuga (1500 x g, 10 min, 4°C), com solução tampão fosfato 0,01M, pH 7.2, para retirar os resíduos da solução saturada de sacarose;

13. Juntar cuidadosamente os sedimentos finais, ressuspendendo-os em 1 mL de solução tampão fosfato;

14. Enumerar os oocistos presentes, em câmara de Neubauer: diluindo 20 µL da suspensão de oocistos purificados em solução tampão fosfato estéril, em 80 µL da solução aquosa de verde de malaquita (0,16%) contendo dodecil-sulfato-sódio a 0,1%; retirar 10µL desta suspensão, transferir para a câmara de Neubauer, aguardar 2-3 minutos e proceder à contagem dos oocistos. Ajustes devem ser feitos para obter um volume final de 1mL e concentração de  $10^7$  oocistos, para a posterior infecção da linhagem celular.

## CULTURA E INFECÇÃO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

A escolha da célula hospedeira é um dos fatores que mais influenciam o cultivo de *Cryptosporidium* e a necessidade de apresentar características semelhantes à das células epiteliais é um dos critérios que deve ser considerado, principalmente a capacidade de aderência e taxa de crescimento **(3,44)**; devem ser excluídas as células

que apresentem crescimento lento ou não contínuo, pobre capacidade de adesão e aquelas que necessitem de meio especial de suplementação **(41)**. As células HCT-8 (*células do adenocarcinoma ileocecal humano*), MDCK (*células Madin-Darby de rim canino*) e MDBK (*células Madin-Darby de rim bovino*) foram eleitas como as que melhor suportam o desenvolvimento do protozoário e apresentam maior susceptibilidade à invasão **(30,36,37,41,43,45)**. Entretanto, a linhagem HCT-8 tem seu uso desaconselhado, em algumas ocasiões, por apresentar uma fluorescência própria **(40)**. A infecção das células hospedeiras pode ser realizada com oocistos, esporozoítos após excitação *in vitro* ou uma mistura de ambos. Se esporozoítos são utilizados, eles também devem ser previamente purificados e sujidades devem ser ausentes na suspensão que permanecerá em contato com a célula hospedeira. Para purificação dos esporozoítos, podem ser usados filtros estéreis de policarbonato, com porosidade nominal de 2,0 µm **(12)** ou de nitrato de celulose **(45)**. Para alguns autores, este protocolo seria mais vantajoso, pois a monocamada celular-hospedeira não estaria sujeita aos fluídos tóxicos liberados pelos oocistos; porém, deve-se considerar a natureza delicada dos esporozoítos, após excitação; assim, a infecção das células hospedeiras deve ser efetuada imediatamente. A excitação pode ser induzida por exposição aos sais biliares e proteases. Villacorta et al. (1996) **(45)** incubaram os oocistos (a 37°C) com taurocolato de sódio (0,22%) e tripsina bovina (0,04%), em solução tampão fosfato, durante 45 minutos.

Quando a infecção da célula hospedeira for efetuada a partir de oocistos, é necessária a sua sanitização realizada com tratamento prévio da suspensão do parasito com soluções anti-bacterianas e antifúngicas, seguidas de tratamento com solução de hipoclorito de sódio a 10% (10 min., 4°C) e lavagens sucessivas com solução tampão fosfato, ressuspensos em meio de cultura celular (contendo soro fetal bovino 10%) e, a seguir, enumerados e adicionados às monocamadas celulares. A etapa de sanitização dos oocistos diminui a possibilidade de contaminação microbiana indesejável, garantindo melhor qualidade do inóculo. É recomendável que após a sanitização com hipoclorito e previamente à inoculação das células hospedeiras, promova-se uma etapa de neutralização empregando solução de tiosulfato de sódio a 0,1%. Qualquer que

seja o método empregado para infectar a célula hospedeira, é extremamente importante distribuir o inóculo de forma igual sobre todas as células, mesmo que a monocamada celular apresente-se homogênea. Os esporozoítos e merozoítos exibem a tendência de infectar células vizinhas **(44)** e, portanto, infecção não uniforme das células hospedeiras pode ocorrer. As taxas de infecção celular *in vitro*, relatadas na literatura variam de 5%-10% **(3)**.

As células hospedeiras devem ser cultivadas, antes da inoculação, em placas de cultura celular, apresentando poços ou concavidades assim como frascos de cultura de tamanho variável, contendo meio de cultura que deve ser selecionado em função da linhagem celular escolhida **(35) (Tabela 28.1)**

Para o destacamento e posterior transferência das células hospedeiras visando a infecção, é empregada uma etapa de incubação em solução (1:1) de tripsina 0, 25% e PBS-EDTA, durante 5 minutos, à 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub>, para o desprendimento das células dos frascos de cultivo originais. Em seqüência, a suspensão celular deve ser vigorosamente pipetada em um volume aproximadamente 10 vezes maior (ponteiros de 200 µL, por exemplo) até que seja promovida a separação das diversas células **(38)**. Após enumeração, as células são semeadas nas concavidades das placas e devem ser mantidas em condições de umidade (85%-95%), na temperatura de 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> (4%-5%) respeitando-se as diferentes características de crescimento de cada linhagem celular. O meio de crescimento celular deve ser suplementado com soro fetal bovino a 10%-15%, durante todo o período de manutenção das células não infectadas. Quando pré-cultivadas em frascos de cultura, aproximadamente 12 a 24 horas antes da infecção, as células devem ser semeadas nas concavidades das placas de cultivo, preferencialmente sobre lamínulas de vidro, com a finalidade de obter uma monocamada celular com 70-80% de confluência **[19]**.

Previamente à inoculação das monocamadas celulares, o meio de cultura deve ser removido e a suspensão de oocistos ou esporozoítos ou uma mistura de ambos, é adicionada, para promover a infecção das células hospedeiras. Após 2 horas de incubação, as placas devem ser lavadas com solução tampão fosfato, para remover os parasitos que não foram capazes de infectar as monocamadas celulares e a seguir, é

adicionado meio de cultivo e suplementação o que permitirá o crescimento parasitário, sob incubação a 37°C **(42)** e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

Entre 48 a 72 horas após a inoculação, o número de parasitos alcança o máximo desenvolvimento e a partir daí, sofre um declínio gradual **(30)**. De acordo com Arrowood (2002) **(3)** o número de estádios parasitários em desenvolvimento iguala-se ou é duas vezes maior ao número original de oocistos do inóculo. Entre os vários fatores que influenciam o cultivo celular *in vitro* de *Cryptosporidium*, estão: o pH, a idade das células hospedeiras e sua integridade, a presença de sujidades celulares no meio de cultura e a degeneração das células hospedeiras, o tempo de armazenamento dos oocistos, a eficiência da excitação e a integridade dos esporozoítos **(44)** O pH exerce um importante papel na manutenção do crescimento do protozoário *in vitro*; sua faixa ótima é de 7.2 a 7.6 **(18,19)** e a troca periódica do meio de cultivo, a cada 2-3 dias pode ser necessária para a manutenção das condições ideais; esta estreita faixa de pH é relevante para a invasão celular e liberação dos estádios parasitários **(30)**; súbitas alterações do pH provocam desprendimento das monocamadas celulares **(19)** e é possível que a flutuação dos valores de pH contribua para a inativação dos microgametas o que explicaria a não obtenção de oocistos nas primeiras tentativas de cultivo *in vitro* do protozoário, na década de 80. Por estes motivos, o tampão HEPES (ácido (N-2-hidroxietil)-piperazina-N'-2etano-sulfônico) é o mais comumente empregado para o cultivo *in vitro* dos coccídios, pois sua capacidade tamponante situa-se na faixa de 6.8-8.2.

O problema do crescimento excessivo do parasito na cultura, seguido de degeneração das monocamadas celulares foi solucionado por Hijjawi et al (2001) **(19)** ao introduzirem a transferência periódica (a cada 2-3 dias) do meio de cultivo (também se sua a diminuição da concentração de soro fetal bovino, para cerca de 4% a 5%). A suplementação do meio de cultivo celular com adição de soro fetal bovino, em concentrações variáveis entre 5% a 10% (que ocasiona um aumento da motilidade do protozoário), vitaminas (ácido ascórbico, pantotenato de cálcio; ácido fólico e ácido para-aminobenzóico) ou açúcares (glicose, galactose, maltose ou manose, em concentrações de 20 a 50 mM) acarreta melhor desenvolvimento do protozoário *in vitro*

(43). Também a insulina exerce um efeito positivo sobre o crescimento parasitário por facilitar a tomada de açúcares pelas células hospedeiras (43). Pouco ou nenhum efeito foi observado quando biotina, riboflavina, niacina, nicotinamida, timidina ou uracil foram adicionadas ao meio de cultivo (25). Choi et al. (2004) (6), ao analisarem o efeito da adição de vários suplementos sobre o cultivo *in vitro* de *C. muris*, observaram que o uso de ácido pirúvico 1mM induziu um aumento significativo do desenvolvimento do protozoário e a suplementação com ácido fólico (2µg/mL) produziu um incremento no desenvolvimento parasitário na ordem de 20%. Quando inosina e adenosina, em concentrações de 200 µM, foram agregadas ao meio de cultivo, foi observado um aumento do número de células parasitadas, sendo predominantes os estádios assexuados do protozoário.

#### TÉCNICA DE EXCISTAÇÃO DOS OOCISTOS PARA OBTENÇÃO DE ESPOROZOÍTOS LIVRES

A infecção das células hospedeiras pode ser promovida pela adição de uma suspensão de oocistos, ou de esporozoítos livres ou ambos. O seguinte protocolo de excitação foi baseado em Villacorta et al. (1996) (45) com algumas modificações:

1. Antes da excitação, os oocistos foram mantidos à 4°C, durante 16 horas, em solução contendo antibióticos e anti-fúngicos;
2. Em banho de gelo, tratar os oocistos com uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, durante 8 minutos;
3. Lavar imediatamente a suspensão de oocistos, em centrífuga (1500xg, 10 min.; 4°C), com solução tampão fosfato 0,01 M.
4. Desprezar o sobrenadante e adicionar ao sedimento 6 ml de solução de tiosulfato de sódio a 1,05%, centrifugando a 1500 x g, 10 min.; 4°C;
5. Centrifugar o sedimento resultante da etapa anterior, nas mesmas condições, mais 3 vezes para a retirada de resíduos da solução de hipoclorito;
6. Centrifugar os oocistos em meio de cultivo celular (EAGLE-MEM), reconstituir o volume inicial (1 mL) com meio de cultivo celular;

7. Promover a liberação dos esporozoítos mediante incubação da suspensão de oocistos a 37°C, com solução contendo desoxicolato de sódio P. A. a 0,22% (Sigma®) e tripsina bovina (0,04%) em PBS, durante 45 minutos (são requeridos de 45 a 60 minutos de incubação para que ocorra total liberação dos esporozoítos).

8. Lavar, em centrifuga (1500 x g, 20 minutos, 4°C) com meio de cultivo celular. Utilizar a suspensão de esporozoítos imediatamente para a infecção das células hospedeiras.

#### CULTURA E INFECÇÃO DAS CÉLULAS MDBK:

Recomenda-se que a cultura das células de rim bovino seja efetuada em placas, contendo lamínulas de vidro, em Meio EAGLE-MEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%, adicionando-se soluções anti-bióticas e anti-fúngicas. ainda solução As placas de cultura celular foram incubadas a 37°C, sob tensão de CO<sub>2</sub> (5%) e 95% de umidade. A infecção das células MDBK com a cepa MMc/Uni de *Cryptosporidium* foi realizada em placas de 24 concavidades contendo lamínulas de vidro, em meio EAGLE-MEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%, adicionado ainda de solução de penicilina (200 U/mL), de estreptomicina (200 µg/mL) e solução de fungizona (2 µg/mL), de acordo com protocolos descritos na literatura **(41,42,45)**. Para os protocolos de infecção foram colocadas 2x10<sup>5</sup> células/mL, em cada concavidade e as placas foram mantidas em estufa a 37°C, em ambiente com 85% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 12-24 horas, as monocamadas celulares que apresentavam 75% de confluência foram utilizadas de acordo com o seguinte protocolo:

1. Lavar as monocamadas celulares, por 3x, com meio EAGLE-MEM (200 µL); acrescentar em cada concavidade da placa de cultivo celular, 200 µL de meio EAGLE-MEM contendo 10<sup>6</sup> parasitas da suspensão de oocistos purificados ou de esporozoítos, após excitação. Utilizar algumas concavidades como controle (não infecta-las);

2. Passadas 2 horas após a infecção, lavar as monocamadas com o mesmo meio (200 µL) por três vezes e, a seguir, acrescentar em cada concavidade, 1 mL de meio EAGLE-MEM, suplementado com soro fetal bovino 4%, solução de penicilina (200

U/mL, de estreptomicina (200 µg/mL) e solução de fungizona (2 µg/mL). Manter as placas de cultivo do protozoário em estufa a 37°C, em ambiente com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

3. O tempo de cultivo é variável em função do objetivo do mesmo (se obtenção de estádios parasitários assexuados, sexuados ou obtenção de oocistos – vide Tabela 2); no caso da cepa MMC/Uni, por exemplo, as placas foram cultivadas durante 96 horas, obtendo-se a presença de merontes (estádios assexuados do protozoário) nas preparações (**Fig. 28. 1**).

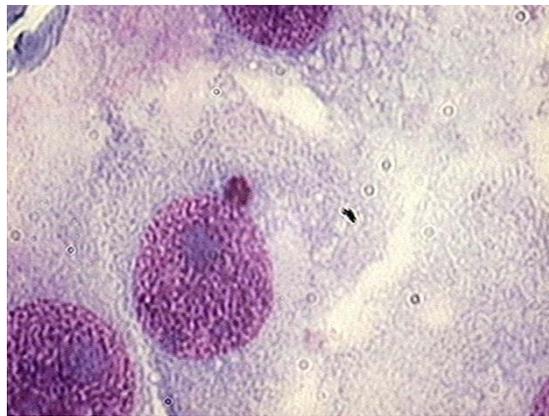


Fig.28.1. Cultivo celular da cepa MMC/Uni de *Cryptosporidium* (de origem humana), em células MDBK (*células Madin-Darby de rim bovino*): meronte, após 96 horas de cultivo (Aumento: 1000x).

#### CONTROLE DE QUALIDADE

1. A cada 24 horas, retirar as placas de cultivo da estufa; deixar em repouso por 3 minutos, observar em microscópio invertido com aumento de 400x para verificar as condições gerais, como aderência ou desprendimento celular e presença de contaminantes.

2. A cada 2-3 dias, é recomendada a substituição do meio de cultura antigo por um novo.

## VISUALIZAÇÃO E ENUMERAÇÃO DE PARASITOS NOS SISTEMAS DE CULTIVO

Para a visualização e quantificação de parasitos nos sistemas de cultivo, vários métodos podem ser empregados. A coloração em lamínulas é amplamente usada uma vez que as células infectadas crescem aderidas à elas. Antes da coloração, as células devem ser fixadas empregando-se acetona, metanol a 4°C ou fixador de Bouin (tempo de fixação: 2 horas) e, a seguir, diversas colorações podem ser usadas tais como a de Giemsa (diluição 1:20 em água destilada; tempo de coloração: 30 minutos), álcool-ácido-resistente modificada para *Cryptosporidium*, hematoxilina-eosina **(6)** a do Azul Alcian ou pelo procedimento combinado usando Azul Alcian (solução alcoólica 1%; 1 min.) e Giemsa (solução aquosa a 20%; 15 min.) **(24)**.

As lamínulas destacadas das placas de cultura são lavadas com solução tampão fosfato (pH 7.2-7.6) e podem ser armazenadas em solução de formalina neutra tamponada a 10%, anteriormente ao exame microscópico. Os parasitos são quantificados, tendo por base a razão de parasitos/nº de células hospedeiras ou campo microscópico. A maior dificuldade reside na correta diferenciação entre os diferentes estádios morfológicos do parasito, considerando que o desenvolvimento do mesmo é focal, isto é, são formados agrupamentos de infecção parasitária.

Os parasitos em desenvolvimento ou completamente desenvolvidos também podem ser visualizados após coloração com anticorpos específicos fluorescentes **(38)** ou mediante teste imunoenzimático, empregando anticorpo policlonal desenvolvido contra os esporozoítos de *Cryptosporidium*. De acordo com Slifko et al. (1997) **(38)** este anticorpo também reage com epítomos dos demais estádios reprodutivos do protozoário, presentes nas culturas. Quando o cultivo celular do protozoário é combinado com as técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR), empregando-se *primers* específicos, a detecção e determinação da infectividade são possíveis **(13)**. A diferenciação entre os diversos estádios parasitários, ao exame microscópico, requer um técnico que tenha grande conhecimento de morfologia do protozoário. É preciso considerar que alguns esporozoítos ou merozoítos falham em infectar a célula hospedeira, permanecendo aderidos à mesma, assumindo um formato arredondado **(3)**

causando grande dificuldade para a correta identificação das formas parasitárias. A cronologia do desenvolvimento de *Cryptosporidium in vitro* e a descrição das principais características dos diversos estádios referentes ao ciclo biológico do protozoário são apresentados na **Tabela 28.2**

**Tabela 28.2.** Cronologia e descrição das principais características do protozoário *Cryptosporidium* spp em sistema de cultivo *in vitro*.

Forma do Parasito	Tempo de infecção	Medidas micrométricas (em $\mu\text{m}$ )	Descrição da morfologia
<b>Trofozoítos</b>	5 h.p.i	2,7 x 2,7	Formato arredondado ou oval.
<b>Merontes (Tipo I)</b>	12-24 h.p.i.	3,7 x 4,0	Apresentam 6 a 8 núcleos ou merozoítos, em arranjo paralelo.
<b>Merontes (Tipo II)</b>	24 h.p.i.	3,1 x 2,8	Contém apenas 4 merozoítos
<b>Microgamontes</b>	48-72 h.p.i.	5,6 x 3,4	14-16 microgametas não flagelados são observados no interior da célula, ao redor de um resíduo.
<b>Macrogamontes</b>	48-72 h.p.i	4,0 x 4,0	Presença de um núcleo periférico e grande.
<b>Oocistos</b>	48-96 h.p.i.	5,0 x 5,0	Oocistos maduros contém 4 esporozoítos
<b>Esporozoítos</b>	72 h.p.i.	5,2 x 1,2	Formato de vírgula, apresentando a extremidade posterior arredondada e a anterior, pontiaguda*.

\*Estes esporozoítos foram visualizados existindo após 72 h.p.i. o que comprova sua origem a partir dos oocistos desenvolvidos em sistema de cultivo *in vitro* (La Charme et al., 2004)  
[23]

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams RB, Guerrant RL, Zu SX, Fang GD, Roche JK. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphological and functional studies in an *in vitro* model. J Infect Dis 169:170-177, 1994.
2. Alves DP, Britto MHSS de, Guaraldo AMA. Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes. Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes. Biotecnol Cienc Desenvol 32:55-60, 2004.
3. Arrowood MJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. Clin. Microbiol Rev15: 390-400, 2002.
4. Bonnin A, Salimbeni I, Dubremetz JF, Harly G, Chavanet P, Camerlynck P. Mise au point d'un modèle experimental de culture *in vitro* des stades asexués de *Cryptosporidium* sp. Ann Parasitol Hum Comp 65:41-43, 1990.
5. Britto MHS, Alves DP, Freitas FFT, Guaraldo AMA. Isolamento de *Cryptosporidium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado em camundongos. VII Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, Campinas, SP. 2000.
6. Choi, M-H, Hong S-T, Chai J-Y, Park W-Y, Yu J-R. In vitro culture of *Cryptosporidium muris* in a human stomach adenocarcinoma cell line. Korean J Parasitol 42:27-34, 2004.
7. Current WL; Long PL. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. J Infect Dis 148:1108-1113, 1983.

8. Current WL, Haynes TB. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 224:603-605, 1984.
9. Current WL. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Dubey JP, Speer CA, Fayer R., Eds., CEC Press, Boca Raton, FL. 31-49, 1990.
10. Current WL, Garcia LS. *Cryptosporidiosis*. *Clin Microbiol Rev* 4:325-358, 1991.
11. Datry A, Danis M, Gentilini M. Développement complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire: applications. *Méd. Sci.* 5:762-766, 1989.
12. Deng MQ, Cliver DO. *Cryptosporidium parvum* development in the BS-C-1 cell line. *J Parasitol* 84:8-15, 1998.
13. Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA LeChevallier M, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture PCR. *Appl Environm Microbiol* 65:3427-3432, 1999.
14. Eggleston MT, Tilley M, Upton SJ. Enhanced development of *Cryptosporidium parvum in vitro* by removal of oocysts toxins from infected cell monolayers. *Proc Helminthol Soc Wash* 61:122-125, 1994.
15. Flanigan TP, Aji T, Marshall R, Soave R, Aikawa M, Kaetzel C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infect Immun* 59:234-239, 1991.
16. Griffiths JK, Moore R, Dooley S, Keusch GT, Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively

increases transmonolayer permeability and causes epithelial cell death. *Infect Immun* 62:4506-4514, 1994.

17. Gut J, Petersen C, Nelson R, Leech J. *Cryptosporidium parvum* *in vitro* cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *J Protozool* 38:S72-S73, 1991.
18. Hamer DH, Ward H, Tzipori S., Pereira ME, Alroy JP, Keusch GT. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to MDCK cells *in vitro*. *Infect Immun* 62:2208-2213, 1994.
19. Hijjawi NS, Meloni, BP, Morgan UM, Thompson RCA. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol* 31:1048-1055, 2001.
20. Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol* 34:769-777, 2004.
21. Johnson AM, Linden K, Ciocciola KM, De Leon R, Widmer G, Rochelle PA. UV inactivation of *Cryptosporidium hominis* as measured in Cell Culture. *Appl Environm Microbiol* 71:2800-2802, 2005.
22. Kuhls TL, Mosier DA, Carwford DL. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. *J Protozool* 38:S74-S75, 1991.

23. Lacharme L, Villar V, Rojo-Vazquez, Suárez S. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). *Microbes Infect* 6:566-571,2004.
24. Lawton P, Naciri M, Mancassola R, Petavy A. Cultivation of *Cryptosporidium parvum* in a non-adherent human monocytic cell line. *J Microbiol Methods* 27:165-173, 1996.
25. Lawton P., Hejl C, Mancassola R, Naciri M; Petavy A-F. Effects of purine nucleosides on the *in vitro* growth of *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol Let* 226:39-43, 2003.
26. Lindsay DS, Sundermann CA, Blagburn BL. Cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos, and pathogenicity of chicken embryo-passaged oocysts. *J Parasitol* 74:288-293, 1988.
27. Lumb J, Smith K, O'Donoghue PJ, Lanser JA. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol Res* 74:531-536, 1988.
28. Maillot C, Favennec L, Francois A, Ducrotte P., Brasseur P. Sexual and asexual development of *Cryptosporidium parvum* in five oocyst- or sporozoite-infected human enterocytic cell lines. *J Euk Microbiol* 44:582-585, 1997.
29. McDonald V., Stables R, Warhurst DC, Barer MR, Blewett DA, Chapman HD, Connonly GM, Chiodini PL, McAdam KPWJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1498-1500, 1990.

30. Meloni BP, Thompson RCA. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum in vitro*. J Parasitol 82:757-762, 1996.
31. Naciri M, Yvore P, Boissieu C de, Esnault E. Multiplication de *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907) *in vitro* entretien d'une souche sur oeufs embryonnes. Rec Med Vet 162:51-56, 1986.
32. Nelson RG, Rosowsky A. Dicyclic and tricyclic diaminopyrimidine derivatives as potent inhibitors of *Cryptosporidium parvum* dihydrofolate reductase: structure-activity and structure-selectivity correlations. Antimicrob Agents Chemother 45:3293-3303, 2001.
33. Petry F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. Microsc Microanal 10:586-601, 2004.
34. Rasmussen KR, Larsen NC, Healey MC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. Infect Immun 61:1482-1485,1993.
35. Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR; Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, De Leon R. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Appl Environm Microbiol 68 (8): 3809-3817, 2002.
36. Rosales MJ, Cifuentes J, Mascaró C. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. Exp Parasitol 76:209-212, 1993.
37. Siripanth C, Punpoowong B, Amarapal P, Thima N, Eampokalap B, Kaewkungwal J. Comparison of *Cryptosporidium parvum* development in various cell lines for

- screening *in vitro* drug testing. Southeast Asian J Trop Med Public Health 35:540-6, 2004.
38. Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. Appl Environm Microbiol 63:3669-3675, 1997.
  39. Tzipori S. Cryptosporidiosis in Perspective. Adv Parasitol 27:63-129, 1988.
  40. Tzipori S. *Cryptosporidiosis*: laboratory investigation and chemotherapy. Adv. Parasitol. 40:187-221, 1998.
  41. Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Comparative development of *Cryptosporidim parvum* (Apicomplexa) in 11 continous host cell lines. FEMS Microbiol Let 118:233-236, 1994.
  42. Upton SJ, Tilley M, Nesterenko MV, Brillhart, DB. A simple and reliable method of producing *in vitro* infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). FEMS Microbiol Lett 118:45-49, 1994 .
  43. Upton Sj, Tilley M, Brillhart DB. Effect of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* HCT-8 cells. J Clin Microbiol 33:371-375,1995.
  44. Upton SJ. *In vitro* Cultivation. *In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Fayer R., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl. 181-207, 1997.
  45. Villacorta I, Graaf D de, Charlier G, Peeters JE. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in MDBK cells. FEMS Microbiol Let 142:129-132, 1996.

46. Widmer G, Akiyoshi D, Buckholt MA, Feng X, Rich SM, Deary KM, Bowman CA, Xu P, Wang Y, Wang X, Buck GA, Tzipori S. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 108:187-197, 2000.
47. Woodmansee DB, Pohlenz JFL. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line, p.306-319. *In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Neonatal Diarrhea*. Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.1983.
48. Woods KM, Nesterenko MV, Upton SJ. Efficacy of 101 antimicrobials and other agents on the development of *Cryptosporidium parvum in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol* 90:603-615, 1996.
49. Yang S, Healey MC, Du C, Zhang J. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. *Infect Immun* 64:349-354, 1996.

**ANEXO I:****Manutenção do Cultivo "in vivo" do *Cryptosporidium* sp.**

ALVES, 2004

**ANEXO II:****Minimum Essential Medium Eagle (MEM)**

Minimum Essential Medium (MEM), developed by Harry Eagle, is one of the most widely used of all synthetic cell culture media. Early attempts to cultivate normal mammalian fibroblasts and certain subtypes of HeLa cells revealed that they had specific nutritional requirements that could not be met by Eagle's Basal Medium (BME). Subsequent studies using these and other cells in culture indicated that additions to BME could be made to aid growth of a wider variety of fastidious cells. MEM, which incorporates these modifications,

includes higher concentrations of amino acids so that the medium more closely approximates the protein composition of cultured mammalian cells. MEM has been used for cultivation of a wide variety of cells grown in monolayers. Optional supplementation of non-essential amino acids to the formulations that incorporate either Hanks' or Earle's salts has broadened the usefulness of this medium. The formulation has been further modified by optional elimination of calcium to permit growth of cells in suspension culture.

COMPONENT	v					
	M 0268 g/L	M 4655 [1X] g/L	M 4642 g/L	M 4780 [1X] g/L	M 0643 g/L	M 1018 g/L
<b>INORGANIC SALTS</b>						
Calcium Chloride·2H <sub>2</sub> O	0.265	0.265	0.185	0.185	0.265	0.185
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767
Potassium Chloride	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Potassium Phosphate Monobasic (anhydrous)	—	—	0.06	0.06	—	0.06
Sodium Bicarbonate	—	2.2	—	0.35	—	—
Sodium Chloride	6.8	6.8	8.0	8.0	6.8	8.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	—	—	0.04788	0.04788	—	0.04788
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.122	0.122	—	—	0.122	—
<b>AMINO ACIDS</b>						
L-Alanine	—	—	—	—	0.0089	0.0089
L-Arginine·HCl	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126	0.126
L-Asparagine·H <sub>2</sub> O	—	—	—	—	0.015	0.015
L-Aspartic Acid	—	—	—	—	0.0133	0.0133
L-Cystine·2·HCl	0.0313	0.0313	0.0313	0.0313	0.0313	0.0313
L-Glutamic Acid	—	—	—	—	0.0147	0.0147
L-Glutamine	0.292	0.292	0.292	0.292	0.292	0.292
Glycine	—	—	—	—	0.0075	0.0075
L-Histidine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Isoleucine	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052
L-Leucine	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052
L-Lysine·HCl	0.0725	0.0725	0.0725	0.0725	0.0725	0.0725
L-Methionine	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
L-Proline	—	—	—	—	0.0115	0.0115
L-Serine	—	—	—	—	0.0105	0.0105
L-Threonine	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048
L-Tryptophan	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
L-Tyrosine·2Na·2H <sub>2</sub> O	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519
L-Valine	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046
<b>VITAMINS</b>						
Choline Chloride	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Folic Acid	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
myo-Inositol	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Niacinamide	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Pyridoxal·HCl	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Riboflavin	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Thiamine·HCl	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Vitamin B-12	—	—	—	—	—	—
<b>OTHER</b>						
Glucose	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phenol Red·Na	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011
<b>ADD</b>						
Sodium Bicarbonate	2.2	—	0.35	—	2.2	0.35
<b>SPECIFICATIONS</b>						
pH at RT (without sodium bicarbonate)	5.9±0.3	N/A	6.7±0.3	N/A	5.1±0.3	6.3±0.3
pH at RT (with sodium bicarbonate)	7.6±0.3	7.3±0.3	7.3±0.3	7.3±0.3	7.5±0.3	7.2±0.3
Osmolality — mOsm/Kg H <sub>2</sub> O (without sodium bicarbonate)	250±5%	N/A	282±5%	N/A	250±5%	287±5%
Osmolality — mOsm/Kg H <sub>2</sub> O (with sodium bicarbonate)	295±5%	302±5%	285±5%	285±5%	294±5%	300±5%
Grams of powder required to prepare 1 L	9.6	N/A	10.7	N/A	9.7	10.8

Formulas



is dyp: Sentamolo in tamntologie: 14

### Anexo III: Aprovação na Comissão de Ética em Experimentação Animal



CEEA/Unicamp

#### Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/Unicamp

#### CERTIFICADO

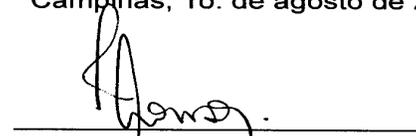
Certificamos que o Protocolo n° **1304-1**, sobre "Manutenção em linhagens de camundongos e infecção *in vitro* de uma cepa de *Cryptosporidium* sp de origem humana", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo / Maria Helena Seabra Soares de Britto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA/Unicamp em **1o. de agosto de 2007**.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol n° **1304-1**, entitled \_\_\_\_\_ is in agreement with the Ethical Principles for 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 **August 1, 2007**.

Campinas, 1o. de agosto de 2007.

  
 Prof. Dr. Stephen Hyslop  
 Vice-Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

## Uma tese é uma tese

“Sabe tese, de faculdade? Aquela que defendem? Com unhas e dentes? É’ dessa tese que eu estou falando. Você deve conhecer pelo menos uma pessoa que já defendeu uma tese. Ou esteja defendendo.

Sim, uma tese é defendida. Ela é feita para ser atacada pela banca, que são aquelas pessoas que gostam de botar banca.

As teses são todas maravilhosas. Em tese. Você acompanha uma pessoa meses, anos, séculos, defendendo uma tese. Palpitantes assuntos. Tem tese que não acaba nunca, que acompanha o elemento para a velhice. Tem até teses pós-morte.

O mais interessante na tese é que, quando nos contam, são maravilhosas, intrigantes. A gente fica curiosa, acompanha o sofrimento do autor, anos a fio. Aí ele publica, te dá uma cópia e é sempre - sempre - uma decepção. Em tese.

Impossível ler uma tese de cabo a rabo. São chatíssimas. É uma pena que as teses sejam escritas apenas para julgamento da banca circumspecta, sisuda e compenetrada em si mesma. E nós? Sim, porque os assuntos, já disse, são maravilhosos, cativantes, as pessoas são inteligentíssimas. Temas do arco-da-velha. Mas toda tese fica no rodapé da história. Pra que tanto sic e tanto apud? Sic me lembra o Pasquim e apud não parece candidato do PFL para vereador? Apud Neto.

Escrever uma tese é quase um voto de pobreza que a pessoa se autodecreta. O mundo pára, o dinheiro entra apertado, os filhos são abandonados, o marido que se vire. Estou acabando a tese. Essa frase significa que a pessoa vai sair do mundo. Não por alguns dias, mas anos. Tem gente que nunca mais volta.

E, depois de terminada a tese, tem a revisão da tese, depois tem a defesa da tese. E, depois da defesa, tem a publicação. E, é claro, intelectual que se preze, logo em seguida embarca noutra tese. São os profissionais, em tese. O pior é quando convidam a gente para assistir à defesa. Meu Deus, que sono. Não em tese, na prática mesmo.

Orientados e orientandos (que nomes atuais!) são unânimes em afirmar que toda tese tem de ser - tem de ser! - daquele jeito. É’ pra não entender, mesmo. Tem de ser formatada assim. Que na Sorbonne é assim, que em Coimbra também. Na Sorbonne, desde 1257. Em Coimbra, mais moderna, desde 1290. Em tese (e na prática) são 700 anos de muita tese e pouca prática.

Acho que, nas teses, tinha de ter uma norma em que, além da tese, o elemento teria de fazer também uma tesão (tese grande). Ou seja, uma versão para nós, pobres teóricos ignorantes que não votamos no Apud Neto. Ou seja, o elemento (ou a elementa) passa a vida a estudar um assunto que nos interessa é nada. Pra quê? Pra virar mestre, doutor? E daí? Se ele estudou tanto aquilo, acho impossível que ele não queira que a gente saiba a que conclusões chegou. Mas jamais saberemos onde fica o bicho da goiaba quando não é tempo de goiaba. No bolso do Apud Neto?

Tem gente que vai para os Estados Unidos, para a Europa, para terminar a tese. Vão lá nas fontes. Descobrem maravilhas. E a gente não fica sabendo de nada. Só aqueles sisudos da banca. E o cara dá logo um dez com louvor. Louvor para quem? Que exaltação, que encômio é isso?

E tem mais: As bolsas para os que defendem as teses são uma pobreza. Tem viagens, compra de livros caros, horas na Internet da vida, separações, pensão para os filhos que a mulher levou embora. É, defender uma tese é mesmo um voto de pobreza, já diria São Francisco de Assis. Em tese.

Tenho um casal de amigos que há uns dez anos prepara suas teses. Cada um, uma. Dia desses a filha, de 10 anos, no café da manhã, ameaçou: - Não vou mais estudar! Não vou mais na escola. Os dois pararam - momentaneamente - de pensar nas teses. - O quê? Pirou? - Quero estudar mais, não. Olha vocês dois. Não fazem mais nada na vida. É só a tese, a tese, a tese. Não pode comprar bicicleta por causa da tese. A gente não pode ir para a praia por causa da tese. Tudo é pra quando acabar a tese.

Até trocar o pano do sofá. Se eu estudar vou acabar numa tese. Quero estudar mais, não. Não me deixam nem mexer mais no computador. Vocês acham mesmo que eu vou deletar a tese de vocês?  
Pensando bem, até que não é uma má idéia!

Quando é que alguém vai ter a prática idéia de escrever uma tese sobre a tese? Ou uma outra sobre a vida nos rodapés da história? Acho que seria uma tesão.”

**Mário Prata**