

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

ESTUDO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Cryptosporidium parvum* EM CAMUNDONGOS BALB-C IMUNOSSUPRIMIDOS COM DEXAMETASONA OU CICLOFOSFAMIDA

RENATA ALCÂNTARA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em Medicina
Veterinária da Universidade Paulista –
UNIP para a obtenção do título de
mestre em Medicina Veterinária.

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO Cryptosporidium parvum EM CAMUNDONGOS BALB-C IMUNOSSUPRIMIDOS COM DEXAMETASONA OU CICLOFOSFAMIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração:
Imunopatologia Veterinária

Orientador:
Prof^a. Dra. Maria Anete Lallo

RENATA ALCÂNTARA DO NASCIMENTO

**São Paulo
2009**

A Deus, que ilumina minha vida.

Ao meu pai, Ubirajara, pelo exemplo de vida, apoio e dedicação em toda minha carreira.

À minha filha, Isabelle, amada e companheirinha.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. **Maria Anete** Lallo, pela orientação, confiança, paciência e atenção, fundamentais em todos os momentos deste estudo.

Ao Prof . Dr . **Eduardo Fernandes Bondan**, professor da UNIP, pelas sugestões imprescindíveis para ao desenvolvimento e conclusão deste estudo.

À Prof^a. Dr^a **Márcia Benedita de Oliveira Silva**, professora da disciplina de Parasitologia da UFTM, pela pronta atenção e orientação na aquisição dos oocistos.

À Prof^a . Dr^a. **Maria Martha Bernardi**, pelo estímulo e ajuda durante estes 2 anos.

À **Cristiane**, técnica do Laboratório de Fisiologia da UNIP, pela ajuda nas mais variadas etapas.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Química da USP pela ajuda e orientação na aquisição dos animais.

Aos **coordenadores** e **professores** do mestrado da UNIP, que gentilmente compartilharam informações e conhecimentos, que hoje fazem parte do crescimento intelectual adquirido.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cy - ciclofosfamida

DNA – ácido desoxirribonucléico

Dx – dexametasona

HE – hematoxilina-eosina

HTC-8 – célula de tumor hepático

IFN – interferon

IgA – imunoglobulina A

IL – interleucina

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UNIP – Universidade Paulista

USP – Universidade de São Paulo

PAS – ácido periódico - Schiff

PCR – reação em cadeia de polimerase

PBS – solução tamponada por fosfato

SCID – imunodeficiência combinada severa

TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Obtenção e Preparação do Inóculo.....	10
3.2 Inoculação Experimental.....	10
3.3 Tratamento Imunossupressivo.....	11
3.4 Diagnóstico da Infecção pelo <i>C.parvum</i>	12
4 RESULTADOS.....	14
5 DISCUSSÃO.....	20
6 CONCLUSÃO.....	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

RESUMO

O *Cryptosporidium* é um protozoário oportunista, que se aproveita da baixa resposta imune dos hospedeiros para se instalar nos intestinos, vias biliares, estômago ou trato respiratório. O objetivo do presente trabalho foi estudar a infecção experimental pelo *Cryptosporidium parvum* em camundongos Balb-c imunossuprimidos farmacologicamente com dexametasona (Dx) ou com ciclofosfamida (Cy). Sessenta camundongos livres de patógenos específicos foram divididos em 6 grupos: Grupo 1 (n = 15) - animais tratados com Dx (10 mg/kg/dia, por via intraperitoneal – ip) e inoculados com *Cryptosporidium parvum*; Grupo 2 (n = 5) - animais tratados com Dx (10 mg/kg/dia, via ip) e não-inoculados com *C. parvum*; Grupo 3 (n = 15) - animais tratados com Cy (75 mg/Kg, duas doses semanais, via ip) e inoculados com *C. parvum*; Grupo 4 (n = 5) - animais tratados com Cy e não-inoculados com *C. parvum*; Grupo 5 (n = 15) – animais não-tratados com fármacos imunossupressores e inoculados com *C. parvum*, e Grupo 6 (n = 5) - animais não-tratados com fármacos imunossupressores e não-inoculados com *C. parvum*. Os camundongos dos grupos 1, 3 e 5 receberam 1×10^3 oocistos de *C. parvum*. Semanalmente, foi coletado um pellet de fezes de cada grupo, submetido à técnica de centrífugo-sedimentação com água-éter e a técnica modificada de Kinyoun a frio. Os animais foram eutanasiados aos 14, 21, 28 e 35 dias pós-inoculação e fragmentos de intestino delgado e baço foram colhidos, fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina. Cortes histológicos dos fragmentos foram corados pela técnica de H-E, PAS, Ziehl-Neelsen e Kinyoun a frio. Os camundongos tratados com Dx (grupo 1) ou Cy (grupo 3) e inoculados com *C. parvum* apresentaram somente pelame eriçado, a partir do 14º dia de inoculação. Nos camundongos dos demais grupos, nenhuma alteração clínica compatível com a infecção foi observada. Oocistos de *C. parvum* foram encontrados nas amostras fecais dos camundongos dos grupos 1 e 3, a partir da 2ª semana pós-inoculação. Os oocistos mostravam-se como estruturas de forma esférica, coradas em vermelho brilhante e medindo de 4 a 6 μm de diâmetro. Nos animais dos demais grupos (2, 4, 5 e 6), não foram observados oocistos nas fezes. Na necropsia, os animais dos grupos 1 e 3, aos 35 dias de infecção, apresentaram petéquias na parede do íleo. No exame histopatológico dos animais dos grupos 1 e 3, a partir da 2ª semana pós-inoculação, encontrou-se discreto infiltrado de células mononucleares na camada muscular e a presença de oocistos nas criptas das vilosidades do íleo. Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que os camundongos Balb-c imunossuprimidos com Dx ou com Cy foram suscetíveis à criptosporidiose experimental, servindo como modelos animais para esta protozoose.

Palavras-chave: Camundongos, ciclofosfamida, *Cryptosporidium parvum*, dexametasona, infecção experimental, modelo animal.

ABSTRACT

Cryptosporidium is an opportunistic protozoan parasite that takes advantage of its hosts' weak immune response to establish itself in the latter's intestines, bile ducts, stomach or respiratory tract. The purpose of this study was to analyze experimental *Cryptosporidium parvum* infection of Balb/c mice pharmacologically immunosuppressed with dexamethasone (Dx) or cyclophosphamide (Cy). Sixty Specific Pathogen Free (SPF) mice were divided into six groups: Group 1 (n=15) – animals treated with Dx (10mg/kg/day, via intraperitoneal injection - ip) and orally inoculated with *Cryptosporidium parvum*; Group 2 (n=5) – animals treated with Dx (10mg/kg/day, via ip) but not orally inoculated with *C. parvum*; Group 3 (n=15) – animals treated with Cy (75mg/kg, twice a week, via ip) and orally inoculated with *C. parvum*; Group 4 (n=5) – animals treated with Cy but not orally inoculated with *C. parvum*; Group 5 (n=15) – animals not treated with immunosuppressant drugs and orally inoculated with *C. parvum*; and Group 6 (n=5) – animals not treated with immunosuppressant drugs and not orally inoculated with *C. parvum*. Mice from 3 oocysts of *C. parvum*. A pellet of feces was Groups 1, 3 and 5 received 1x10 collected weekly from each group, which was then subjected to the centrifugation sedimentation technique with water-ether and then to the modified cold Kinyoun technique. The animals were euthanized 14, 21, 28 and 35 after inoculation and fragments of their small intestine and spleen were collected, then formalin-fixed at 10% in a closed container and paraffin-embedded. Histological incisions of the fragments were stained with the H-E, PAS, Ziehl-Neelsen and cold Kinyoun techniques. Mice treated with Dx (Group 1) or Cy (Group 3) and orally inoculated with *C. parvum* presented only bristling fur, starting 14 days after inoculation. Mice from the other groups did not present any observable clinical alteration compatible with the infection. Oocysts of *C. parvum* were found in the fecal samples of the mice in Groups 1 and 3 starting two weeks after inoculation. Oocysts were spherical-shaped structures, stained bright red and measured 4 to 6 µm in diameter. No oocysts in the feces of the animals from the remaining groups (2, 4, 5 and 6) were observed. In the necropsy, the animals from Groups 1 and 3 presented petechias on the ileum wall 35 days after being infected. In the histopathological examination of the animals in Groups 1 and 3, a discrete infiltration of the mononuclear cells of the muscle layer was discovered along with the presence of oocysts in the crypts of the ileum villi. From the results obtained, it can be concluded that the Dx or Cy immunosuppressed Balb/c mice were susceptible to experimental cryptosporidiosis, thus serving as animal models for this protozoan.

Keywords: Mice, cyclophosphamide, *Cryptosporidium parvum*, dexamethasone, experimental infection, animal models.

1 INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição de criptosporidiose em bovinos (PANCIERA et al.,1971), o *Cryptosporidium parvum* tem provado ser um agente etiológico muito importante de diarreia em neonatos de mamíferos domésticos (SURL; KIM, 2006). O *Cryptosporidium* é um protozoário intracelular, que coloniza células do epitélio digestório e respiratório do homem e de muitas outras espécies, incluindo os animais domésticos e de laboratório, os mamíferos silvestres, as aves domésticas e silvestres, os répteis e os peixes (TZIPORI,1988; O´DONOGHUE, 1995).

Os primeiros casos de criptosporidiose humana foram reconhecidos em 1976 por NIME et al. e MEISEL et al., respectivamente, em uma criança e um adulto imunossuprimido, ambos com um quadro de diarreia. No entanto, somente a partir de 1982, a preocupação com o agente atingiu seu apogeu quando foram descritos casos de enterite grave causada por *cryptosporidium sp.* em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida - AIDS, colocando em risco suas vidas (DUBEY et al.,1990).

O *Cryptosporidium parvum* é um grupo eucariota pertencente ao filo Apicomplexa e ao gênero *Cryptosporidium*. Existem muitas controvérsias quanto à diversidade desse gênero. Segundo THOMPSON et al. (2008), devem ser consideradas cerca de 14 espécies, destacando-se entre elas o *C. parvum*, espécie de distribuição cosmopolita e um agente de zoonose. É o principal agente das infecções em seres humanos e está amplamente disseminado entre os mamíferos. Sabe-se que o *C. parvum* não é uma espécie homogênea uma vez que a análise isoenzimática e o seqüenciamento do DNA revelaram diferenças entre os oocistos isolados a partir de várias espécies animais parasitadas, e identificados vários genótipos (FAYER et al.,

2000). Os membros do gênero *Cryptosporidium* compreendem parasitas monoxênicos com um complexo ciclo de vida, envolvendo multiplicação assexuada e sexuada, além de possuir habilidade para determinar auto-infecção (ENEMARK et al., 2003). A infecção se inicia pela ingestão de oocistos esporulados, que liberam os esporozoítos. No tubo digestório, os esporozoítos aderem-se às células epiteliais e são englobados por microvilosidades da membrana dos enterócitos, formando vacúolo parasitóforo, intracelular e extra citoplasmático (De GRAAF et al., 1999).

Após a multiplicação assexuada ou merogonia, são formados merontes tipo I, podendo dar origem a novos merontes iguais ou do tipo II; já os merontes tipo II darão origem à fase sexual ou gametogonia com a diferenciação em estádios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Após a fertilização, haverá a formação do oocisto. A esporulação ocorre *in situ* com o desenvolvimento de dois tipos de oocistos - oocisto de parede fina auto-infectante capaz de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro e oocisto de parede espessa altamente resistente às condições ambientais, eliminado nas fezes (DUBEY et al., 1990; TZIPORI, 1988).

A patogenia e o quadro clínico da criptosporidiose são influenciados por vários fatores como a espécie animal, a idade, a competência imunológica, o genótipo de *C. parvum* e a associação com outros patógenos. A infecção pode variar de subclínica à grave, e os animais jovens geralmente, são mais suscetíveis às formas infecciosas de maior gravidade. Na maioria das vezes, é autolimitante em hospedeiros imunocompetentes, porém manifesta-se de forma crônica e grave em indivíduos com deficiências imunológicas. Em vários mamíferos, incluindo o homem, os sinais clínicos manifestos na criptosporidiose compreendem diarreia aquosa, anorexia, perda de peso, dores abdominais e desidratação (TZIPORI, 1988). As lesões histopatológicas encontradas na criptosporidiose incluem: atrofia das

vilosidades intestinais, hiperplasia e dilatação das criptas, que ficam preenchidas por restos leucocitários, parasitas livres e células epiteliais descamadas. Na lâmina própria, encontra-se um infiltrado inflamatório usualmente com neutrófilos, plasmócitos, linfócitos e macrófagos (DUBEY et al., 1990; ENEMARK et al., 2003).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro responsáveis pelo controle da criptosporidiose são pobremente compreendidos. Tanto a resposta humoral quanto a celular estão envolvidas, porém atribui-se a imunidade celular à responsabilidade de acabar com a infecção, sendo essa função atribuída aos linfócitos TCD4+ e ao interferon- γ (IFN- γ) (SURL; KIM, 2006). Quando camundongos atímicos (*nude*) são inoculados com *C. parvum*, a infecção adquire um caráter crônico (HEINE et al., 1984). Observa-se que a administração de IFN- γ inibe o desenvolvimento de *C. parvum* em culturas de células (POLLOK et al., 2001). Esses resultados sugerem que a resposta imune celular é fundamental, para que um organismo possa resistir ou se recuperar da infecção.

Estudos epidemiológicos indicam grande produção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* no soro de indivíduos infectados, assim como tem sido demonstrados altos os níveis de IgA na mucosa intestinal (BENHAMOU et al., 1995). Embora sejam observados altos níveis de anticorpos específicos contra o *C. parvum* no soro de indivíduos com AIDS, os mesmos apresentam diarreia profusa e persistente. Esses achados reforçam a idéia de que a resposta celular é a responsável pela proteção efetiva contra o parasita.

O diagnóstico de criptosporidiose baseia-se na pesquisa de oocistos nas fezes. Esses oocistos devem ser concentrados pelas técnicas de água-éter ou de centrífugo-flutuação com solução saturada de sacarose e depois devem ser corados com técnicas específicas para os oocistos, tais como a coloração de Kinyoun, de

Ziehl-Nielsen modificada ou a técnica de auramina. Também são utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais para detectar oocistos nas fezes por meio de técnicas de imunofluorescência direta ou indireta (CURRENT, 1990; THOMPSON et al., 2008).

Entre os métodos indiretos, podem-se mencionar as técnicas de imunofluorescência indireta e teste imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos. Entretanto, essas técnicas são recomendadas no controle da infecção e não para o diagnóstico, uma vez que a mera presença de anticorpos anti - *cryptosporidium* não significa necessariamente a presença da infecção ativa (CURRENT & BLAGBURN, 1990).

A técnica de PCR constitui uma alternativa ao diagnóstico convencional do *Cryptosporidium* tanto em espécimes fecais quanto em amostras ambientais. Embora o PCR seja rápido, sensível e acurado, apresenta limitações para a detecção de ácido nucléico de organismos inviáveis ou de ácido nucléico nu, assim como pode apresentar resultado em falso-positivo pela contaminação laboratorial. Para o diagnóstico em espécimes clínicos, devem-se empregar primeiro uma técnica de concentração dos oocistos e a coloração específica para a triagem. Em seguida, as amostras positivas devem ser submetidas ao PCR para a confirmação da espécie e do genótipo envolvido (De GRAAF et al., 2003; JOHNSON et al., 1995).

Estudos moleculares revelaram que o *C. parvum* possui grande variabilidade genotípica, sendo os genótipos humano (38%) e bovino (62%), os mais observados nas infecções zoonóticas. Dessa forma, para que a criptosporidiose humana com o genótipo bovino ocorra é necessário um contato direto com os animais infectados, tais como bovinos, ovinos e caprinos, ou que haja contaminação ambiental, especialmente, da água e de alimentos (THOMPSON et al., 2008).

Apesar de numerosas pesquisas terem sido realizadas nas últimas duas décadas, empregando-se substâncias químico ou imunoterápicas em testes *in vivo* e *in vitro* contra o *cryptosporidium*, nenhum tratamento específico ou preventivo foi aprovado contra a criptosporidiose (NAJDROWSKI et al., 2007).

Considerando que o desenvolvimento do *Cryptosporidium parvum* ocorre dentro da célula do hospedeiro (FAYER et al., 1997), o cultivo *in vitro* desse protozoário em culturas celulares é possível, entretanto, observa-se que a conclusão do ciclo de vida e a produção de oocistos são realizadas com dificuldade (HIJJAWI, 2003). Das diferentes linhagens de células utilizadas para o desenvolvimento do parasita, as células HCT-8 têm mostrado melhores resultados, e a sua habilidade de reproduzir o parasita é comparável aos modelos animais (MELONI; THOMPSON, 1996; PEREZ CORDÓN et al., 2007).

Embora seja possível a utilização de culturas celulares, a produção de oocistos de *cryptosporidium* tem sido realizada em bezerros neonatos, que são mais suscetíveis à infecção e produzem grandes quantidades de oocistos (ENEMARK et al., 2003). Carneiros e camundongos neonatos têm sido empregados como modelos de infecção para os testes de fármacos anti-*Cryptosporidium* (MOORE et al., 2001; NOORDEEN, et al., 2002; VIEL et al., 2007). Entretanto, o uso desses modelos animais exige infra-estrutura adequada e altos investimentos financeiros. Essas restrições têm fomentado pesquisas que utilizam camundongos adultos portadores de imunodeficiências, naturalmente adquiridas, tais como os camundongos *nude*, *severe combined immunodeficient (SCID)* ou *knockout*, como os camundongos nocauteados para IFN- γ (*IFN- γ knockout mice*) (MOORE et al., 2001; SURL; KIM, 2006; MILER et al., 2007; VIEL et al., 2007).

Os camundongos *SCID* apresentam profunda linfopenia, função defeituosa dos linfócitos B e T, e conseqüente deficiência das respostas humoral e celular. Por sua vez, os camundongos atímicos ou *nude* possuem um defeito no cromossomo 11, que se manifesta com o desenvolvimento de timo rudimentar, em que não ocorre normalmente a maturação de linfócitos T. Em decorrência disso, há poucos ou nenhum linfócito T maduro nos tecidos linfóides periféricos e falhas de todas as reações imunes celulares (ABBAS et al., 1997). Os camundongos *nude*, *SCID* ou *knockout* adquirem a infecção experimental e a mantém num estado crônico e persistente. A eliminação dos oocistos pelas fezes começa entre o 4° e 5° dia pós-inoculação e a infecção dura aproximadamente 10 a 15 dias, dependendo da dose de inóculo administrada. Esses animais apresentam perda de peso significativa, fezes diarréicas e gelatinosas, caracterizando um quadro de enterite, porém outras regiões podem apresentar o parasita, tais como a bexiga e o estômago (YOU; MEAD, 1998; MILLER et al., 2007).

Miller et al. (2007) realizaram a imunossupressão de camundongos C57BL/6 com uma dose única de 600 mg/kg de acetato de metilprednisolona e, após 24 horas, inocularam oocistos de *C. parvum*. Esse grupo foi comparado aos de animais geneticamente imunossuprimidos (*nude* e *SCID*) e de animais imunocompetentes. Os autores observaram que os animais imunossuprimidos, natural ou geneticamente, necessitaram de um inóculo semelhante aos animais imunocompetentes para apresentar a infecção, porém os animais imunossuprimidos liberam oocistos pelas fezes por um período maior. Com relação à indução química do estado de imunossupressão, Lallo et al. (2002) inocularam *Encephalitozoon cuniculi*, um protozoário intracelular obrigatório e oportunista, em camundongos Balb-c imunossuprimidos com Dx. A imunossupressão pela Dx tornou os

camundongos mais suscetíveis à infecção, e demonstrou resultado semelhante ao observado em animais com imunodeficiência genética, tais como os camundongos *nude* e *SCID*.

Os passos iniciais da resposta imune são mais comprometidos com a utilização dos corticosteróides e compreendem o processamento de antígenos, a proliferação celular, a síntese de citocinas e a diferenciação celular. Por outro lado, a resposta imune de memória é pouco afetada por esse grupo de drogas. Comprovou-se que a atividade imunossupressiva ocorre quando o tratamento com o glicocorticóide precede a exposição ao antígeno (DIASIO e LoBUGLIO, 1996).

Os camundongos constituem uma espécie bastante sensível aos efeitos imunodepressores dos esteróides, e a linfocitólise é o principal fator na diminuição do número de linfócitos circulantes, reduzindo sua participação nas reações imunológicas e inflamatórias. Os glicocorticóides exercem suas funções anti-inflamatórias atuando em vários aspectos da resposta orgânica às agressões, influenciando eventos celulares (polimorfonucleares e células linfóides), vasculares e o metabolismo dos mediadores pró-inflamatórios. Atuam nos leucócitos deprimindo sua capacidade quimiotática e fagocitária, além de deprimirem a síntese de citocinas por macrófagos, bem como sua habilidade de processamento e apresentação antigênica (JERICÓ, 1999). Estudos recentes indicam que os corticóides inibem a proliferação de linfócitos T e, conseqüentemente, todas as respostas imunes dependentes desses linfócitos, em especial a expressão dos genes que codificam as citocinas (IL-1, IL-2, IL-6 IFN- γ e TNF- α) (BARNES, 2007).

A ciclofosfamida (N,N-di-2-cloroetil-N'-O-trimetilenofosfodiamida) é um importante agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada, possuindo 2 grupos alquil com propriedade de formar ligações covalentes cruzadas com substâncias

nucleofílicas apropriadas nas células. As ações farmacológicas mais relevantes dos agentes alquilantes são as que perturbam os mecanismos básicos envolvidos com a atividade mitótica, o crescimento e a diferenciação celular. Seus efeitos citotóxicos, embora dependentes da proliferação para serem expressos, não são específicos do ciclo celular, podendo, assim, a droga agir em qualquer estágio do mesmo. A droga parece afetar todos os componentes da resposta imune, tanto humoral como celular, embora seus efeitos sobre os linfócitos B pareçam ser mais intensos do que sobre os linfócitos T (JACOBSON, 1982; SELDIN e STEINBERG, 1988).

Garcia et al. (2004) utilizaram esse fármaco em ovinos, demonstrando seus efeitos imunossupressores pela diminuição da titulação de anticorpos vacinais antibrucelose, intensa linfopenia e hipogamaglobulinemia. Lallo e Bondan (2005) utilizaram ciclofosfamida em camundongos Balb-c e obtiveram um modelo adequado para o estudo da meningoencefalite pelo *Encephalitozoon cuniculi*, quadro raramente observado em camundongos imunocompetentes.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o curso da infecção experimental pelo *Cryptosporidium parvum* em camundongos Balb-c tratados com duas drogas imunossupressoras, o glicocorticóide Dx e o alcalóide Cy, a fim de determinar um modelo experimental que reproduza com maior similaridade a infecção em camundongos geneticamente imunocomprometidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preparação do Inóculo

Os oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram obtidos do departamento de ciências biológicas da UFTM – Uberaba – MG. São oriundos de fezes de bezerros recém-nascidos infectados pelo protozoário, sendo as espécimes fecais armazenados em dicromato de potássio a 2,5% a 4^o C (uma parte das fezes para duas de dicromato) por no máximo 6 meses. Os oocistos foram concentrados e purificados pela técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de sacarose e gradiente descontínuo de sacarose. O inóculo foi preparado diluindo-se os oocistos em PBS contendo penicilina (60 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (MILLER et al., 1990). Para a contagem dos oocistos de *C. parvum* na amostra, foi empregada a técnica estabelecida por CASEMORE (1991), contando-se os oocistos em esfregaços preparados com 10 µl da suspensão, colocados sobre uma lâmina e corados com a técnica modificada de Kinyoun (a frio).

3.2 Inoculação Experimental

Com a finalidade de reproduzir experimentalmente a infecção pelo *Cryptosporidium parvum*, foram utilizados 60 camundongos Balb-c SPF (*specific pathogen-free*), machos, com idades variando de 60 e 90 dias e peso variando de 20 a 30g. Os animais foram distribuídos da seguinte forma: Grupo 1 (n = 15) - animais tratados com Dx e inoculados com *C. parvum*; Grupo 2 (n = 5) - animais tratados com Dx e não-inoculados com *C. parvum*; Grupo 3 (n = 15) - animais tratados com Cy e inoculados com *C. parvum*; Grupo 4 (n = 5) - animais tratados com Cy e não-inoculados com *C. parvum*; Grupo 5 (n = 15) – animais não-tratados com fármacos

imunossupressores e inoculados com *C. parvum*, e Grupo 6 (n = 5) - animais não-tratados com fármacos imunossupressores e não-inoculados com *C. parvum*.

Os animais dos grupos 1, 3 e 5, foram inoculados, por via oral, com 1×10^3 oocistos de *C. parvum* diluídos em 1 ml de PBS. Os animais dos demais grupos (grupos 2, 4 e 6) receberam igual volume de solução PBS estéril, pela mesma via de administração.

3.3 Tratamento Imunossupressivo

Os animais dos grupos 1 e 2 foram tratados com 10 mg/kg de Dx - (Azium®) (LALLO et al., 2002), administradas diariamente por via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado dois dias antes da inoculação de *C. parvum* e foi mantido por todo o período de duração do experimento. Por sua vez, os camundongos do grupo 3 e 4 receberam duas doses semanais de 75 mg/kg de Cy - Genuxal® (LALLO; BONDAN, 2005), por via intraperitoneal, como tratamento imunossupressor, começando dois dias antes da inoculação do protozoário, sendo também mantido por todo o período experimental. Os animais dos grupos 5 e 6 não receberam tratamento com fármacos imunossupressivos.

Para diminuir a possibilidade de infecções oportunistas durante o período experimental, os animais foram isolados em biotério previamente desinfectado, e foram mantidos em caixas contendo maravalha esterilizada por autoclavagem (130°C por 20 minutos) e trocada três vezes por semana, recebendo *ad libitum* água e ração peletizada, também esterilizadas.

3.4 Diagnóstico da infecção pelo *C. parvum*

Semanalmente, a partir do 7^o. dia pós-inoculação, foi coletado um pellet de fezes dos animais de cada grupo para avaliar a eliminação de oocistos. As amostras fecais foram submetidas à técnica de centrífugo-sedimentação com água-éter para a concentração dos oocistos (CURRENT, 1990). A partir do sobrenadante, empregando-se uma alça bacteriológica, foram confeccionados esfregaços. Após secagem e fixação com metanol, os esfregaços foram corados pela técnica modificada de Kinyoun a frio (De CARLI, 2007).

Os oocistos de *C. parvum* eliminados nas fezes foram contados em único campo de microscópio com aumento de 400 vezes. As amostras fecais receberam um escore baseado no número de oocistos, variando de 0 a 4+. Receberam escore 0, amostras sem oocistos detectados, 1+ para as amostras com menos de 5 oocistos por lâmina, 2+ para as amostras com mais 5 e menos de 50 oocistos por lâmina, 3+ para as amostras com mais de 50 e menos de 100 oocistos por lâmina e 4+ para as amostras que tiveram mais de 100 oocistos por lâmina. Para cada grupo, foi obtida uma média de eliminação de oocistos fecais por todo o período do experimento.

Para se confirmar a infecção, os animais foram eutanasiados, de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista sob o registro nº 020/08, aos 14, 21, 28 e 35 dias pós-inoculação e fragmentos de intestino delgado e baço foram colhidos, mantidos em solução de formol tamponado a 10%, por aproximadamente 72 horas. Amostras de fragmentos teciduais foram submetidas à desidratação, diafanização e inclusão em parafina. A partir do material incluído em parafina, foram obtidos cortes transversais de 4 a 5 μ m e montados em lâminas de vidro. A seguir, foram desparafinados em xilol e reidratados em uma seqüência

decrecente de álcoois. As lâminas foram fixadas em metanol por 5 minutos antes de serem submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (H-E), PAS, Giemsa, Ziehl-Neelsen e Kinyoun.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz com os aumentos de 50, 100 e 400 vezes. A partir das amostras do íleo, foram selecionadas aleatoriamente 10 vilosidades intestinais por camundongo e o número de parasitas foi contado por vilosidade, com aumento de 400 vezes. A infecção foi quantificada por escores em uma escala de 0 a 3 de acordo com os seguintes critérios: 0 – nenhum parasita observado; 1- pequeno número de parasitas distribuídos de forma localizada (menos de 10% do tecido colonizado); 2- moderado número de parasitas amplamente distribuídos pelo tecido (entre 10 e 50% do tecido colonizado) e 3- grande número de parasitas amplamente distribuídos pelo tecido (mais de 50% do tecido colonizado). Com os resultados individuais, calculou-se a média para os grupos.

4 RESULTADOS

Os camundongos tratados com Dx (grupo 1) ou Cy (grupo 3) e inoculados com *C. parvum* apresentaram somente pelame eriçado, a partir do 14º dia de inoculação, não sendo observados quaisquer outros sintomas da infecção. Nos camundongos dos demais grupos, nenhuma alteração clínica compatível com a infecção foi observada.

Nas amostras fecais dos camundongos dos grupos 1 (Dx) e 3 (Cy) foram observados oocistos de *C. parvum*, a partir da 2ª semana após a inoculação. A quantidade de oocistos contada por campo de microscópio com aumento de 400 vezes, no período compreendido entre a 2ª e a 4ª semana, ficou entre 1 e 5 oocistos por campo (1+). Na 5ª semana de infecção, esse número aumentou para 2+ (entre 5 e 50 oocistos por campo), para os dois grupos (Quadro 1). Nos animais dos demais grupos (2, 4, 5 e 6), não foram observados oocistos até o final do experimento.

Os oocistos do *C. parvum* encontrados nos exames de fezes apresentaram grande variação de formato e coloração. Na maioria das vezes, mostravam-se como estruturas de forma esférica, coradas em vermelho brilhante e medindo de 4 a 6 µm de diâmetro, na coloração de Kinyoun a frio.

Na necropsia, os animais tratados com Dx (grupo 1) e Cy (grupo 3), aos 35 dias de infecção, apresentaram petéquias na parede mucosa do íleo. Os demais grupos não apresentaram lesões. Observou-se que todos os animais imunossuprimidos (grupos 1, 2, 3, 4) apresentaram diminuição aparente do volume do baço quando comparados aos animais não-imunossuprimidos. A redução foi em média de 50% do tamanho normal.

No exame histopatológico, os animais dos grupos 1 (Dx) e 3 (Cy) apresentaram, na mucosa do íleo distal, áreas com metaplasia escamosa e, na

camada muscular, discreto infiltrado de células mononucleares. Essas alterações foram mais evidenciadas aos 35 dias de infecção. Os demais animais não manifestaram quaisquer lesões intestinais.

As formas parasitárias mais evidenciadas foram os oocistos, encontrados, especialmente, nas criptas das vilosidades do íleo dos animais dos grupos 1 (Dx) e 3 (Cy), em todas as datas de sacrifício. O escore de infecção variou entre 1 e 2, sendo que para os dois grupos, prevaleceu um número pequeno de parasitas distribuídos de forma localizada, acometendo menos de 10% do tecido analisado (classificação 1). Apenas na última data de sacrifício, o número de parasitas aumentou e o escore de classificação passou a 2 (Quadro 2). Não foram observadas formas parasitárias nos animais dos grupos 2, 4, 5 e 6.

No 35º dia todos os camundongos dos grupos 1, 2, 3, e 4 apresentaram evidenciada depleção celular, sobretudo das áreas B-dependentes dos folículos linfóides, com visualização de inúmeros macrófagos e restos celulares. As áreas timo-dependentes ao redor da bainha periarteriolar permaneceram aparentemente normais, enquanto a celularidade da polpa vermelha mostrou-se bastante aumentada, indicando eritropoiese extramedular intensa.

Quadro 1. Quantificação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* observado na análise das amostras fecais dos camundongos inoculados.

Escore dos grupos de acordo com o número de oocistos*			
Data da análise	Grupo 1 (Dx)	Grupo 3 (Cy)	Grupo 5 (Controle)
1º semana (7º dia)	0	0	0
2º semana (14º dia)	1+	1+	0
3º semana (21º dia)	1+	1+	0
4º semana (28º dia)	1+	1+	0
5º semana (35º dia)	2+	2+	0

*Classificação das amostras fecais de acordo com o número de oocistos observados por campo com aumento 1000 x: nenhum oocisto – 0; menos que 5 oocistos – 1+; entre 5 e 50 oocistos – 2+; entre 50 e 100 oocistos – 3+ e acima de 100 oocistos – 4+.

Quadro 2. Colonização do parasita no íleo terminal em camundongos dos grupos 1, 3 e 5.

Escore de infecção*			
Data do sacrifício	Grupo 1 (Dx)	Grupo 3 (Cy)	Grupo 5 (Controle)*
2º semana (14º dia)	1	1	0
3º semana (21º dia)	1	1	0
4º semana (28º dia)	1	1	0
5º semana (35º dia)	2	2	0

*Escore de classificação da infecção: 0 – nenhum parasita observado; 1- pequeno número de parasitas distribuídos de forma localizada (menos que 10% do tecido colonizado); 2- moderado número de parasitas amplamente distribuídos pelo tecido (entre 10 e 50% do tecido colonizado) e 3- grande número de parasitas amplamente distribuídos pelo tecido (mais que 50% do tecido colonizado).

5 DISCUSSÃO

Desde a sua primeira descrição como causa de diarreia no homem e nos demais animais, na década de 70, o nível de conhecimento sobre o protozoário parasita da espécie *Cryptosporidium parvum* tem aumentado consideravelmente (FAYER et al., 1997) e hoje, ele é reconhecido como um dos parasitas oportunistas mais comuns (GUERRANT, 1997). Atualmente, a maioria dos estudos tem se concentrado na caracterização genética e molecular desse agente de doença, enquanto poucas pesquisas envolvendo a infecção experimental de animais têm sido realizadas. Nesse sentido, existe uma demanda urgente de estudos envolvendo modelos experimentais que mostrem como as variações genéticas estão relacionadas com as variações clínicas, diagnósticas, terapêuticas e epidemiológicas (ENEMARK, 2003).

Muitas espécies de hospedeiros para o *Cryptosporidium parvum* exibem algum grau de resistência relacionado à idade e ao *status* imunológico. A infecção clínica é mais comum e severa em neonatos de animais mamíferos, em aves jovens ou em indivíduos imunocomprometidos, que apresentam diarreia crônica, algumas vezes, fatal. Por outro lado, nos adultos e nos imunocompetentes, a infecção do intestino delgado se manifesta com diarreia transitória e autolimitante, revelando baixa morbidade e mortalidade (CURRENT; BLAGBURN, 1990). A mesma apresentação é observada nos animais de laboratório, especialmente em camundongos, que mostram resistência à infecção experimental *pelo C. parvum* quando adultos e suscetibilidade enquanto neonatos (NOVAK; STERLINGI, 1991).

Com o objetivo de promover a infecção experimental de camundongos com o *C. parvum*, a sua resistência inata ou imunológica à infecção deve ser eliminada ou

suprimida. Nesse sentido, a inoculação de *C. parvum* em camundongos *nude* (atímicos) e *SCID*, que possuem deficiência genética na sua habilidade de desenvolver resposta imune efetiva, produz uma infecção crônica (McDONALD et al., 1992; UNGAR et al., 1990). Nos camundongos atímicos, observa-se falta de linfócitos T enquanto nos camundongos *SCID*, não são encontrados tanto linfócitos T quanto B (ABBAS et al., 1997).

Com a finalidade de compreender melhor o papel da resposta imune contra o *Cryptosporidium parvum*, Rasmussen e Healey (1992) administraram linfócitos T CD4+ ou CD8+ para camundongos *SCID*, cronicamente infectados com o parasita. Observaram que os linfócitos T CD4+ erradicaram a infecção, enquanto os linfócitos T CD8+ apenas diminuíram a eliminação de oocistos pelos animais infectados, sem, contudo, acabar com a infecção.

Uma vez que a aquisição e manutenção de camundongos *nude* ou *SCID* é difícil e apresenta alto custo, vários fármacos imunossupressores têm sido empregados para tornar camundongos adultos suscetíveis à infecção pelo *C. parvum*, destacando-se entre eles os corticóides. Esse grupo de fármacos determina apoptose dos linfócitos e supressão de monócitos e de eosinófilos, alterando assim, a resposta imune à infecção (JERICÓ, 1999).

Cicmanec e Reasoner (1997) utilizaram Dx injetável, em dias alternados, durante o período experimental, e conseguiram uma infecção crônica pelo *C. parvum* em camundongos C57BL, uma linhagem mais suscetível à criptosporidiose. Da mesma forma que esses autores, no presente trabalho, utilizando Dx diariamente, obteve-se uma infecção crônica pelo *Cryptosporidium parvum*, contudo, foram empregados camundongos Balb-c, uma linhagem de camundongos naturalmente mais resistente à infecção por esse protozoário. A infecção obtida foi semelhante à

observada em animais imunossuprimidos geneticamente, tais como os camundongos C57BL *nude* ou *SCID* (McDONALD et al., 1992; UNGAR et al., 1990).

Miller e Schaefer (2007b) obtiveram resultados parecidos ao utilizar Dx por via oral, na água de consumo, entretanto, a mensuração de linfócitos foi muito instável em função da variabilidade na ingestão hídrica diária. Observaram que a taxa de eliminação de oocistos diminuía à medida que a taxa de linfócitos T CD8+ no sangue aumentava. O esquema de administração de dexametasona utilizado no presente experimento se baseou nos resultados obtidos por Lallo et al. (2002), ao estudar a infecção experimental de camundongos Balb-c com o *Encephalitozoon cuniculi*, um protozoário oportunista. Os autores observaram o desenvolvimento de encefalitozoonose nos camundongos imunossuprimidos farmacologicamente de forma semelhante à obtida em camundongos *SCID* ou *nude*.

Utilizando o mesmo esquema de Lallo et al. (2002), Pereira (2007) evidenciou importante diminuição na quantidade de leucócitos e de linfócitos B e T circulantes, mediante administração diária de Dx durante 28 dias, por via intraperitoneal, sem encontrar a variabilidade no número de leucócitos e linfócitos descrita por Miller e Schaefer (2007b). Embora a administração contínua da dexametasona exija manipulação diária dos animais, podendo desencadear estresse, não foi observado nesse estudo qualquer problema relacionado com o manuseio desse grupo de animais. Não houve mortes causadas pelo uso desse imunossupressor, durante o período em questão, fato evidenciado tanto no grupo 1 (infectado) quanto no 2 (controle), tratando-se, portanto, de um esquema seguro de imunossupressão, capaz de proporcionar a infecção experimental de camundongos Balb-c pelo *C. parvum*.

De acordo com Miller e Schaefer (2006), a administração de uma dose única de acetato de metilprednisolona em diversos períodos da infecção experimental com *C. muris* em camundongos CF-1, levou a respostas diferenciadas em relação à infecção ou à eliminação do parasita nas fezes. Observaram que a ação do fármaco sobre os animais infectados dependia das condições imunológicas pré-existentes quando o agente imunossupressor era iniciado. Se o imunossupressor fosse administrado antes da produção de oocistos, havia um atraso na sua produção, porém o tempo de eliminação de oocistos aumentava. Se, por outro lado, a imunossupressão fosse iniciada durante a produção de oocistos, após uma infecção maciça, a eliminação de oocistos diminuía e não havia recidiva da infecção, sugerindo, dessa forma, que os linfócitos T e B existentes nessa fase, talvez não fossem críticos para a continuidade da resposta imune a partir desse ponto, considerando a infecção pelo *C. muris*.

Neste estudo, a administração de Dx foi iniciada concomitantemente à inoculação experimental e perdurou por todo o período do experimento. A eliminação de oocistos começou na 2ª semana de infecção e persistiu até o final do estudo. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Hikosaka et al. (2005), ao inocular camundongos *SCID* com 1000 oocistos de *C. parvum* por via oral, que apresentaram período pré-patente de 10 a 14 dias. Dessa forma, assim como observado por Miller e Schaefer (2006), é recomendado que a imunossupressão seja iniciada concomitantemente à inoculação e perdure por todo o período experimental para a manutenção da infecção e da eliminação de oocistos (MILLER; SCHAEFER, 2007b).

Neste experimento, a utilização da Cy como agente imunossupressor, proporcionou uma infecção crônica semelhante à observada com o emprego da Dx ,

com apenas uma morte. Pereira (2007) mensurou os efeitos imunossupressivos da Cy e da Dx em camundongos Balb-c e não observou diferença significativa na diminuição do número de linfócitos T entre os animais tratados com os dois fármacos, por outro lado, o número de linfócitos B diminuiu significativamente nos animais imunossuprimidos com Cy. Essa atividade, marcadamente imunossupressiva sobre os linfócitos B, não alterou o curso e a manifestação da infecção neste experimento, o que reforça a pequena importância das células B na imunidade contra a criptosporidiose.

Por outro lado, a ciclofosfamida pode comprometer todos os mecanismos de ação antiparasitária do sistema imune, por sua atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T CD₄⁺ (SELDIN e STEINBERG, 1988). A Cy mostrou também promover monocitopenia mediante sua administração regular em intervalos de três dias (VAN FURTH, 1988; VAN'T WOUT *et al.*, 1989). É provável que a combinação dessas duas atividades (linfopênica e monocitopênica) seja as responsáveis pela ocorrência da infecção por *C. parvum* nos camundongos tratados com Cy, na presente investigação. O fato da Cy diminuir consistentemente o número de linfócitos T CD₄⁺, considerada a célula mais importante na erradicação de criptosporidiose, explica a semelhança observada na infecção pelo *Cryptosporidium parvum* nos animais imunossuprimidos com Dx ou com Cy.

O protocolo de administração da Cy durante o período experimental foi baseado no protocolo utilizado por Lallo *et al.* (2005), que obtiveram infecção experimental de camundongos Balb-c pelo protozoário oportunista *E.cuniculi*, sem observar morte dos animais imunossuprimidos.

As alterações histológicas esplênicas, caracterizadas pela depleção linfóide, principalmente de áreas B-dependentes do baço, foram encontradas nos animais

tratados com Dx ou Cy , inoculados ou não com *C. parvum*, constatações essas compatíveis com a toxicidade descrita das drogas (CALABRESI e PARKS JR, 1987; CHABNER *et al.*, 1996) e com sua potente ação supressora da imunidade (STOCKMAN *et al.*, 1973; JACOBSON, 1982).

A maioria das amostras pesquisadas revelou pequena quantidade de oocistos. Em geral, a eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* é intermitente e a quantidade variável, dependendo da fase do ciclo em que a infecção se encontra, assim como da suscetibilidade do hospedeiro à infecção (ANDERSON, 1982; UNGAR, 1990). Portanto, é importante que técnicas de diagnóstico sensíveis sejam utilizadas nos casos em que há suspeita de criptosporidiose, além da repetição dos exames com diferentes amostras.

Dessa forma, a utilização de Dx ou de Cy pode proporcionar um estado de imunossupressão capaz de tornar camundongos Balb-c adultos suscetíveis à infecção crônica pelo *Cryptosporidium parvum* de forma semelhante ao que é observado em camundongos *SCID* ou *nude*, servindo, assim, como modelos animais para o estudo da criptosporidiose. Como não foram observados efeitos colaterais que limitem o uso desses fármacos, na dose e no período descritos, pode-se escolher qualquer um deles, devendo-se levar em consideração para essa escolha o custo e a facilidade de administração. O custo da Dx é muito inferior ao da Cy porém o uso diário pode restringir sua aplicação.

Os fármacos empregados neste estudo são amplamente utilizados como agentes imunossupressores ou quimioterápicos na área de clínica, tanto para seres humanos quanto para os demais animais. Assim, quando se observar diarreia em pacientes medicados com esses fármacos, o *Cryptosporidium parvum* pode ser considerado como agente etiológico da mesma.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitiram concluir que:

- Houve depleção linfóide nas áreas B – dependentes do baço dos camundongos tratados com Dx ou Cy, inoculados ou não com *C. parvum*.

- Observou-se eliminação de oocistos na 2ª semana de infecção e manteve-se até o final do estudo, porém a maioria das amostras revelou-se pequena quantidade de oocistos.

- A utilização de Cy como agente imunossupressor proporcionou infecção crônica semelhante à observada no emprego de Dx.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Celular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p.341-361.

ANDERSON, B.C. Cryptosporidiosis in Idaho lambs: natural and experimental infection. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.181, p.151-153, 1982.

BARNES, P.J. How corticosteroides control inflammation: quintiles prize lecture 2005. **British Journal of Phamacology**, v.148, p.245-254, 2007.

BENHAMOU, Y.; KAPEL, N.; HOANG, C.; MATTA, H.; MEILLTE, D.; MAGNE, D.; RAPHAEL, M.; GENTILINI, M.; OPOLON, P.; GOBERT, J.G. Inefficacy of intestinal secretory immune response to *Cryptosporidium* in acquired immunodeficiency syndrome. **Gastroenterology**, v.108, p.627-635, 1995.

CALABRESI, P.; PARKS JR., R.E. Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. *In*: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 7° ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. p. 817-856.

CASEMORE, D.P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Clinical Pathology**, v.44, p.445-451, 1991.

CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CALABRESI, P. Antineoplastic agents. *In*: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 1233-1287.

CICMANEC, J.L.; REASONER, D.J. Enhanced production of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunosuppressed mice. *In*: FRICKER, C.R.; CLANCY, J.L.; ROCHELLE, P.A. **International Symposium on Waterborne *Cryptosporidium* Proceedings**. American Waterworks Association, Denver, p.127-131, 1997.

CURRENT, W.L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. *In*: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. p.31-49.

CURRENT, W.L.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. *In*: LONG, P.L. **Coccidiosis of man and domestic animals**. Boston: CRC Press, 1990. p.155-185.

De CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 215-263.

De 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.

DIASIO, R.B.; LoBUGLIO, AF. Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. *In*: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics**. New York: International,1996. p.1292-1308.

DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes Infections**, v.4, p.1059-1066, 2002.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. p.199.

ENEMARK, H.L.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P.; HEEGAARD, P.M.H; VIGRE, H.; AHRENS, P.; THAMSBORG, S.M. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* – evaluation of an animal infection model. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.35-57, 2003.

FAYER, R.; SPEER, C.A.; DUBEY, J.P. The general biology of *Cryptosporidium*. *In*: FAYER, R. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press,1997.p.1-42.

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

FINCH, G.R.; DANIELS, C.W.; BLACK, E.K.; SCHAEFER, F.W.; BELOSEVIC, M. Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.3661-3665, 1993.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S.P.; ALVES, G.J.; CHATE, S.C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M.A. Uso de ciclofosfamida em modelo de imunossupressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.115-119, 2004.

GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: na emerging, highly infectious threat. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.51-57, 1997.

HEINE, J; MOON, H.W.; WOODMANSEE, D.R. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. **Infection and Immunity**, v.43, p.856-859, 1984.

HIJJAWI, N. In vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell cultures. In THOMPSON, R.C.A; ARMSON, A.; RYAN, U.M. **Cryptosporidium from molecules to disease**. Amsterdam: Elsevier, 2003.p.233-253.

HIKOSAKA, K.; SATOH, M.; KOYAMA, Y.; NAKAI, Y. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocysts discharge from SCID mice. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p.173-176, 2005.

JACOBSON, R.H. Immunodeficiency models in characterization of immune responses to parasites - an overview. **Veterinary Parasitology**, v. 10, p. 141-54, 1982.

JERICÓ, M.M. Antiinflamatórios esteroidais. *In*: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p.232-233.

JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK, N.J.; GRIFFIN, D.W.; MISENE, L.; ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3849-3855, 1995.

LALLO, M.A.; SANTOS, M.J.; BONDAN, E.F. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.621-626, 2002.

LALLO, M.A.; BONDAN, E.F. Experimental meningoencephalitis by *Encephalitozoon cuniculi* in cyclophosphamide-immunosuppressed mice. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.63, p.246-251, 2005.

MCDONALD, V.; DEER, R.; UNI, S.; ISEK, M.; BANCROFT, G.J. Immune responses to *Cryptosporidium muris* e *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. **Infection and Immunity**, v.60, p.3325-3331, 1992.

MTAMBO, M.M.A.; WRIGHT, S.E.; NASH, A.S.; BLEWETT, D.A. Infectivity of a Cryptosporidial species isolated from a diarrheic cat. **Research of Veterinary Science**, v.60, p.61-63, 1996.

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

MELONI, B.P.; THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* *in vitro*. **Journal of Parasitology**, v.82; p.757-762, 1996.

MILLER, R.A.; BORNDON, M.A.; MORTON, W.R. Experimental cryptosporidiosis in a primate model. **Journal of Infectious Diseases**, v.161, p.312-315, 1990.

MILLER, T.A.; SCHAEFAR, F.W. Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.6683, 2006.

MILLER, T.A.; SCHAEFAR, F.W. Methylprednisolone acetate immune suppression produces differing effects on *Cryptosporidium muris* oocyst production depending on when administered. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.77-84, 2007a.

MILLER, T.A.; SCHAEFAR, F.W. Changes in mouse circulating leukocyte numbers in C57BL/6 in mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.147-157, 2007b.

MILLER, T.A.; WARE, M.W.; WYMER, L.J.; SCHAEFAR, F.W. Chemically and genetically immunocompromised mice are not more susceptible than

immunocompetent mice to infection with *Cryptosporidium muris*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.99-105, 2007.

MOORE, D.; WATERS, W.R.; WANNERMUEHLER, M.J.; HARP, J.A. Treatment with agmatine inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in infant mice. **Journal of Parasitology**, v.87, p.211-213, 2001.

MORGAN, U.M.; CONSTANTINE, C.C.; FORBES, D.A.; THOMPSON, R.C.A. 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.

NAJDROWSKI, M.; HECKEROTH, A.R.; WACKWITZ, C.; GAWLOWSKA, S.; MACKENSTEDT, U.; KLIEMT, D.; DAUGSCHIES, A. Development and validation of cell culture based assay for in vitro assessment of anticryptosporidial compounds. **Parasitology Research**, v.101, p.161-167, 2007.

NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v.70, p.592, 1976.

NOORDEN, F.; HORADAGODA, N.U.; FAIZAL, A.C.M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAZAK, M.A.A.; ARULKANTHAN, A. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.217-225, 2002.

NOVAK, S.M.; STERLING, C.R. Susceptibility dynamics in neonatal Balb-c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Protozoology**, v.38 (Suplem.), p.1035-1045, 1991.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal of Parasitology**, v. 25, p.139-195, 1995.

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-484, 1971.

PEREIRA, A. Efeitos imunossupressores da dexametasona, ciclosporina e ciclofosfamida sobre linfócitos T e B de camundongos Balb-c. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Paulista (UNIP), 54p, 2007.

PEREZ CORDÓN, G.; MARIN, C.; ROMERO, D.; ROSALES, C.; SÁCHEZ MORENO, M; ROSALES, M.J. More productive in vitro culture of *Cryptosporidium parvum* for better study of the infra- and extracellular phases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.567-571, 2007.

POLLOK, R.C.; FARTHING, M.J.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; SANDERSON, I.R.; McDONALD, V. Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. **Gastroenterology**, v.120, p.99-107, 2001.

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

REESE, N.C.; CURRENT, W.L.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. **American Journal of Tropical Medicina and Hygiene**, v.32, p.226-229, 1982.

SELDIN, M.F.; STEINBERG, A.D. Immunoregulatory agents. *In*: GALLI, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. New York: Raven Press, 1988. p. 911-934.

STOCKMAN, G.D.; HEIM, L.R.; SOUTH, M.A.; TRENTIN, J.J. Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. **The Journal of Immunology**, v.110, p.277-282, 1973.

SURL, C.G; KIM, H.C. Concurrent response to challenge infection with *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed C57BL/6N mice. **Journal of Veterinary Science**, v.7, p.47-51, 2006.

THOMPSON, R.C.A; PALMER, C.S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v.177, p.18-25, 2008.

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

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

VAN FURTH, R. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. *In*: GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. New York: Raven Press, 1988. p. 281-295.

VAN'T WOUT, J.W.; LINDE, I.; LEIJH, P.C.J.; VAN FURTH, R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal conditions and during acute inflammatory reaction. **Inflammation**, v. 13, p. 1-14, 1989.

VIEL, H.; TOCQUES, H.; MARTIN, J. Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. **Parasitology Research**, v.102, p.163-166, 2007.

YOU, X.; MEAD, J.R. Characterization of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in IFN- γ knockout mice. **Parasitology**, v.117, p.525-531, 1998.

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.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)